

HAPTENSPEZIFISCHE ANTIKÖRPER
GEGEN EINEN
PHOSPHORSÄUREESTER

Reiner Kühlmann

Disbui. München

1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554617_0075

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. U. Lösch

HAPTENSPEZIFISCHE ANTIKÖRPER
GEGEN EINEN
PHOSPHORSÄUREESTER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Reiner Kühlmann
aus
Heilbronn

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. U. Lösch

Korreferent: Prof. Dr. K. Tempel

Tag der Promotion: 24. Juli 1987

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	6
2.1 Tiermaterial	6
2.2 Hapten und Trägerproteine	6
2.3 Adjuvans und Immunmodulatoren	7
2.4 Antiseren und Standardsubstanzen	7
2.5 Kopplung des Haptens an Trägerprotein	8
2.6 Immunisierung und Serumgewinnung	9
2.7 Affinitätschromatographie	13
2.8 Rocket-Immunelektrophorese	16
2.9 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	17
2.10 Statistik	21
3. ERGEBNISSE	22
3.1 Kopplung des Haptens an verschiedene Trägerproteine	22
3.2 Haptenspezifischer ELISA	25
3.3 Antikörperantwort nach Immunisierung mit Hapten-Carrier-Komplexen	28
3.4 Gesamt-IgG-Konzentrationen bei den dysgammaglobulinämischen UM-B19-Hühnern	44
4. DISKUSSION	45
5. ZUSAMMENFASSUNG	58
6. SUMMARY	59
7. TABELLEN	60
8. LITERATURVERZEICHNIS	86

ABKÜRZUNGEN

AK	Antikörper
BE	Blutentnahme
BGG	bovines Gammaglobulin
BSA	bovines Serumalbumin
CIEIA	Competetive inhibition enzyme immunoassay
DYS	dysgammaglobulinämisches Huhn
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCA	Freund`s complete adjuvant
HC	Hämocyanin
HSA	Humanserumalbumin
Ig	Immunglobulin
LPS	Lipopolysaccharid
LSL	Lohmann Selected Leghorn
OA	Eialbumin
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PSE	Phosphorsäureester
UCD	University of California, Davis
UM	Universität München

1. EINLEITUNG

Phosphorsäureester spielen in der Tiermedizin als Verursacher von Vergiftungen eine nicht unerhebliche Rolle. Wegen ihrer starken insektiziden Wirkung kommen Phosphorsäureester in der Landwirtschaft als Pflanzenschutzmittel und in der Tiermedizin als Ekto- und Endoparasitaria sowohl äußerlich als auch peroral zur Anwendung. Durch unsachgemäße Anwendung oder Lagerung von Pflanzenschutzmitteln oder durch Überdosierung von entsprechenden Arzneimitteln kann es dabei zu Intoxikationen bei allen Haustierarten kommen. Ebenso treten Vergiftungserscheinungen auf, wenn sich Tiere, die mit Phosphorsäureestern behandelt worden sind, selbst oder gegenseitig belecken (Lützrodt, 1954; Jolly, 1957; Jackson et al., 1960; Fürst, 1965; Leuzinger und Pasi, 1970; Reece and Handson, 1982). Die Toxizität der Phosphorsäureester beruht auf einer indirekten parasymphomimetischen Wirkung. Durch Phosphorylierung des esteratischen Zentrums der Cholinesterase kommt es zur irreversiblen Hemmung dieses Enzyms und somit zur Kumulation des körpereigenen Acetylcholins (Grob, 1963; Matsumura, 1985).

Demnach äußern sich Vergiftungen mit Phosphorsäureestern zunächst auch in starken Schweiß- und Speichelsekretionen, Durchfall, unkontrolliertem Harn- und Kotabgang, Bradykardie, Blutdruckabfall und Miosis. Diese Symptome sind der muskarinartigen Wirkung des Acetylcholins zuzuschreiben und treten tierartlich unterschiedlich stark ausgeprägt auf. Bei längerem Bestehen der Vergiftung kann es dann auch zur Erregung und Depolarisation der Nicotinrezeptoren mit Hemmung der ganglionären und neuromuskulären Erregungsübertragung kommen, was sich in Muskelzuckungen, -krämpfen und -lähmungen, auch der Atemmuskulatur, äußert (Matsumura, 1985). Als Spätfolgen können sich bei Mensch und Huhn Lähmungserscheinungen als Folge einer Demyelinisierung der Nervenscheiden einstellen (Jolly, 1957; Davies, 1963).

Je nach Stärke und Dauer der Vergiftung gestaltet sich die Therapie mit Atropin und Cholinesterasereaktivatoren vom Oximtyp oft sehr schwierig, und ein letaler Ausgang ist nicht selten (Koelle, 1957; Leuzinger und Pasi, 1970).

Phosphorsäureestervergiftungen werden bisher routinemäßig indirekt durch Bestimmung der Cholinesteraseaktivität diagnostiziert (Rappaport et al., 1959; Silvestry, 1977). Dabei werden jedoch auch Vergiftungen mit anderen Cholinesterasehemmern, z.B. Carbamaten mit erfaßt, bei welchen eine Oximtherapie kontraindiziert ist (Kraft, 1984; Matsumura, 1985). Der spezifische Nachweis von Phosphorsäureestern in Boden-, Wasser-, Futter- oder Serumproben erfolgt durch gaschromatographische Verfahren. Derartige Nachweisverfahren sind allerdings sehr schwierig durchzuführen, erfordern teure Geräte, eine aufwendige Probenaufbereitung und geschultes Personal (Sass et al., 1982).

Ein Ziel dieser Arbeit soll es deshalb sein, das Prinzip eines spezifischen, einfach durchzuführenden und empfindlichen Nachweises für Phosphorsäureester zu entwickeln. Als Modell diene der Phosphorsäureester 1,2,2-Trimethyl-propylpara-amino-phenyl-phosphonat (PSE), der von der Organisatie voor toegepast natuurwetenschappelijk Onderzoek (TNO) in Rijswijk, Niederlande, als gering toxische Substanz zur Verfügung gestellt wurde.

Mit Hilfe in diesem Zusammenhang durchgeführter Immunisierungsverfahren sollen gleichzeitig weitere Informationen über die Ursache des Immundefekts der seit 1965 am hiesigen Institut gezüchteten Hühnerlinie UM-B19 erhalten werden (Brügge-mann et al., 1967).

Die bezüglich des Haupthistokompatibilitätslocus homozygote UM-B19 Hühnerlinie (Fiedler et al., 1980) tritt phänotypisch in zwei verschiedenen Formen in Erscheinung:

1. Normogammaglobulinämie mit normalen Serum IgG- und IgM-Werten bei erhöhtem Serum IgA- Spiegel.
2. Dysgammaglobulinämie mit einem IgG- Synthesemangel, was zu sehr niedrigen, zum Teil nicht mehr meßbaren SerumIgG-Spiegelnführt. Die Serum IgM- und IgA-Werte sind dabei erhöht (Lösch et al., 1982; Schraner et al., 1982).

Da ein Teil der Tiere einige Wochen nach dem Schlupf eine kurz andauernde IgG- Bildung zeigt und bei einigen Tieren, meist ab der Zeit der Geschlechtsreife normale IgG- Werte gemessen werden (transitorische Form der Dysgammaglobulinämie), muß eine grundsätzliche Fähigkeit zur IgG- Synthese vorhanden sein (Lösch et al., 1981).

Bisherige Untersuchungen, die mit Vollantigenen durchgeführt wurden, nämlich mit dem T-Zell abhängigen Antigen HSA (Storandt,1983; Altmann,1984) und dem T-Zell unabhängigen Brucella abortus- Antigen(Lösch et al., 1982; Wanke, 1982) sowie Versuche mit keimfreier Aufzucht der Küken deuten darauf hin, daß die Dysgammaglobulinämie der UM-B19 Linie auf eine immunologische Toleranz zurückzuführen ist, deren Ursache in einer verzögerten Bursaentwicklung liegt. Ebenso liegen Hinweise auf ein gestörtes Verhältnis zwischen T-Helferzellen und T-Supressorzellen vor (Kühlmann-Rabens et al., 1987).

Gerade zur Erforschung von Toleranzmechanismen und von B-T-Zellkooperationen haben sich in der Immunologie jedoch Haptene als besonders geeignet erwiesen (Katz et al., 1970; Sarvas et al.,1974; Snippe and Kamp,1975; Moody et al.,1978). Haptene sind niedermolekulare Substanzen, die zwar mit spezifischen Antikörpern reagieren können, für sich selbst aber nicht in der Lage sind, eine Antikörperbildung zu induzieren. Dazumüssensiezuerst an Vollantigene, vorzugsweise Proteine, gekoppelt werden (Landsteiner, 1945; Erlanger, 1980; Hurn et al., 1980). Derartig gebundene Haptene wirken dann wie eine antigene Determinante des Trägerstoffes. Dabei spielt die Zahl der gekoppelten Hapteneinheiten pro Trägerproteinmolekül



für die Stärke der Immunantwort eine wesentliche Rolle (Pinckard, 1978).

In der vorliegenden Arbeit sollen die bisherigen Untersuchungen mit dem Hapten Dinitrophenol, die ebenfalls auf das Vorliegen einer immunologischen Toleranz und auf ein gestörtes T-Helfer-T-Suppressor-Zellverhältnis hinweisen (Trüby, 1987), mit PSE fortgeführt werden. Dabei sollen FCA, LPS und Levamisol als Immunmodulatoren zum Einsatz kommen.

FCA, einer Suspension abgetöteter Mykobakterien (*M. butyricum*, 0,5mg/ml) in Mineralöl, wird eine allgemeine Steigerung der Immunantwort zugesprochen. Beim Haushuhn wird eine immense Erhöhung der "7S"-Immunglobulin-Konzentration nach FCA-Injektion beschrieben (Tam and Benedict, 1975). DYS-Tiere weisen nach FCA-Injektion erhöhte IgM- und IgA-Konzentrationen und gleichartig immunisierte Kontrolltiere nur erhöhte Serum-IgG-Konzentrationen auf (Starker, 1978; Klumpner, 1980; Fiedler et al., 1981; Wanke, 1982).

LPS, eine Lipid A-reiche Fraktion aus der Zellwand von *Salmonella minnesota* soll durch seine mitogenen Eigenschaften eine eventuell verminderte T-Helfer-Aktivität kompensieren (Kolb et al., 1976; Izui et al., 1981) und diese mögliche Ursache der Dysgammaglobulinämie damit durchbrechen können (Altmann, 1984).

Levamisol wurde ursprünglich als Anthelmintikum entwickelt. Da es außerdem eine thymosinähnliche, regulierende Wirkung auf ein gestörtes Verhältnis der T-Zellsubpopulationen hat (Renoux and Renoux, 1977; Goldstein, 1978; Simoons et al., 1979), soll durch seinen Einsatz diese mögliche Ursache der Dysgammaglobulinämie überwunden werden.

Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es,

1. das Prinzip eines spezifischen, empfindlichen und leicht durchzuführenden immunologischen Nachweisverfahrens für Phosphorsäureester zu entwickeln und
2. weitere Einblicke in das Wesen der Dysgammaglobulinämie der UM-B19-Hühnerlinie nach Immunisierung mit PSE-Carrier-konjugaten zu erhalten.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Tiermaterial

2.1.1 Dysgammaglobulinämische Hühner:

Männliche und weibliche Hühner der im Hause gezüchteten Linie UM-B19.

2.1.2 Kontrolltiere:

Nicht typisierte männliche und weibliche immunologisch intakte Hühner der Lohmann-Selected-Leghorn-Linie.

2.1.3 Kaninchen:

3 männliche Kaninchen (Deutsche Riesen).

2.1.4 Alter und Haltung der Tiere:

Alle Hühner waren bei Versuchsbeginn älter als 3 Monate und nicht älter als 1 Jahr.

Die Kaninchen waren bei Versuchsbeginn 3 Monate alt.

Die Tiere wurden auf Gitterrosten in Drahtkäfigen gehalten.

Die Hühner wurden mit handelsüblichem Legehennenalleinfutter, die Kaninchen mit handelsüblichem Kaninchenfutter in Pelletform gefüttert. Wasser und Futter stand allen Tieren ad libitum zur Verfügung.

2.2 Hapten und Trägerproteine

2.2.1 Hapten:

Als Hapten wurde das Organophosphat 1,2,2-Trimethyl-propyl-p-aminophenylphosphonat-hydrochlorid (PSE) von der Organisatie voor toegepast natuurwetenschappelijk Onderzoek, Rijswijk, Niederlande, bezogen.

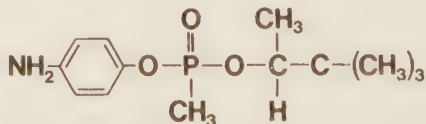


Abb.1: Strukturformel von PSE

2.2.2 Trägerproteine:

Humanes Serumalbumin (HSA), Bovines Serumalbumin (BSA) und Ovalbumin (OA) wurden von der Firma Sigma, St.Louis, USA, Hämocyanin (HC) aus *Helix pomatia* von der Firma Serva, Heidelberg, und Bovines Gammaglobulin (BGG) von der Firma Behring, Marburg bezogen

2.3 Adjuvans und Immunmodulatoren

Freund's Complete Adjuvant (FCA) wurde von der Firma Difco Laboratories, Detroit, USA, Lipopolysaccharid (LPS) von *Salmonella minnesota* Re 595 von der Firma Sigma, St.Louis, USA, und Levamisol als HCl-Salz von der Firma Calbiochem, LaJolla, USA, bezogen.

2.4 Antiseren und Standardsubstanzen

2.4.1 Anti- Huhn- Immunglobuline (Ig)

Isotypspezifische Kaninchen-anti-Huhn-Ig wurden wie bei Hoffmann-Fezer und Lösch (1983) beschrieben hergestellt. Nach affinitätschromatographischer Reinigung (s.u.) wurde die Kopplung an Alkalische Phosphatase der Firma Boehringer, Mannheim, nach der Methode von Avrameas (1969) durchgeführt.

2.4.2 Anti-Kaninchen-Ig

Peroxidasegekoppeltes Ziegen-anti-Kaninchen-Ig wurde von der Firma Paesel, Frankfurt, bezogen.

2.4.3 Hühner-Ig-Standard

Als Hühner-IgG-Standard wurden Seren hochimmunisierter Kontrollhühner, als Hühner-IgM-und-IgA-Standard Seren hochimmunisierter dysgammaglobulinämischer Tiere über PSE-Sepharose 4B bzw HSA-Sepharose 4B affinitätschromatographisch gereinigt

(s.u.) und antikörperfreien Agammaseren zugesetzt. Mittels Rocket-Immunelektrophorese wurde ihre isotypspezifische Immunglobulinkonzentration bestimmt (s.u.).

2.4.5 Kaninchen-Ig-Standard

Als Kaninchen-Ig-Standard dienten über PSE-Sepharose 4B affinitätschromatographisch gereinigte Kaninchen-anti- PSE-Antikörper. Ihre Konzentration wurde mittels Proteinbestimmung nach Bradford (1976) gemessen, wobei bovines Gammaglobulin der Firma Behring, Marburg als Referenzsubstanz diente.

2.5 Kopplung des Haptens an Trägerprotein

Zur Bindung des Haptens an Trägerproteine wurde die Diazokopplung nach Suttner et al.(1977) gewählt. Dabei wird das Hapten über seine freie Aminogruppe an eine freie Aminogruppe des Carriers gebunden.

2.5.1 Diazotierung des Haptens

Zu einer 1%igen Lösung von PSE in HCl (0,1 mol/l) wurde tropfenweise 1%ige wässrige NaNO_2 -Lösung gegeben. Die dabei freiwerdende salpetrige Säure (HNO_2) wurde mit Kaliumjodid-stärkepapier (Fa. Merck, Darmstadt) nachgewiesen. Wenn sich 15 Minuten nach der letzten Tropfenzugabe noch HNO_2 nachweisen ließ, war die Diazotierung vollständig und die Reaktion abgeschlossen. Zur Kontrolle wurden spektralphotometrisch die Extinktionsmaxima von nicht diazotiertem und diazotiertem PSE bestimmt.

2.5.2 Kopplung des diazotierten PSE an Trägerprotein

Das Trägerprotein wurde in gesättigter Boraxlösung gelöst. Unter ständigem Rühren wurde das diazotierte PSE langsam zugegeben. Durch Zugabe geringer Mengen gesättigter Boraxlösung wurde der pH-Wert ständig über 9,0 gehalten. Sowohl die Proteinkonzentration als auch die Menge der PSE-Zugabe

wurden dabei in verschiedenen Versuchsansätzen variiert. Durch Beginn der Dialyse gegen wässrige NaCl-Lösung (0,15 mol/l) wurde die Reaktion beendet. Dies geschah wegen der unterschiedlichen Stabilität der Kopplungsprodukte nach 2-20 Stunden Reaktionszeit. Während der 3-tägigen Dialyse zum Entfernen des nicht gekoppelten PSE wurde die NaCl-Lösung 3 mal täglich gewechselt (= insgesamt ca. 100-faches Volumen).

2.5.3 Bestimmung der Kopplungsrate

Die Kopplungsrate wurde nach der Methode von Fenton und Singer (1971) bestimmt, die darauf beruht, daß bei der Diazokopplung hauptsächlich Histidin- und Tyrosinreste des Carrierproteins reagieren.

Dabei gelten folgende Formeln:

$$mAT = (11,18 \times E_{490 \text{ nm}} - 2,74 \times E_{420 \text{ nm}}) \times 10^{-5}$$

$$mAH = (5,14 \times E_{420 \text{ nm}} - 2,93 \times E_{490 \text{ nm}}) \times 10^{-5}$$

mAT = Molarität des Azotyrosins

mAH = Molarität des Azohistidins

$E_{490 \text{ nm}}$ = Extinktion bei 490 nm

$E_{420 \text{ nm}}$ = Extinktion bei 420 nm

Der Proteingehalt des Kopplungsproduktes wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Als Referenzsubstanz wurde dabei das jeweilige Trägerprotein verwendet.

2.6 Immunisierung und Serumgewinnung

Die intravenöse Applikation erfolgte bei den Hühnern in die Vena cutanea ulnaris, bei den Kaninchen in die Vena auricularis lateralis bzw. medialis.

Die intramuskuläre Applikation erfolgte bei den Hühnern in die Pektoralismuskulatur, bei den Kaninchen in die kaudale

Oberschenkelmuskulatur.

Die subkutane Applikation bei den Kaninchen erfolgte seitlich am Thorax.

Jeweils direkt vor der Immunisierung wurde durch Venenpunktion eine Blutentnahme (BE) durchgeführt.

Das in verschließbaren Einmalserumröhrchen der Fa. Sarstedt, Nümbrecht, aufgefangene Blut wurde 3 Stunden bei 37° C inkubiert, anschließend im Kühlschrank abgekühlt und danach bei ca. 1000g 20 Minuten lang abzentrifugiert.

Bis zur Auswertung wurden die Seren bei -20° C aufbewahrt.

2.6.1 Standardtiere (PSE-Sta)

Zur Gewinnung hochtitriger Seren wurden 4 Kontrollhühner und 4 dysgammaglobulinämische Hühner nach folgendem Schema immunisiert:

Tag 0	BE 0	20mg/kg KGW HSA-PSE i.v.
Tag 14	BE 1	20mg/kg KGW HSA-PSE i.v.
Tag 21	BE 2	20mg/kg KGW HSA-PSE + 0,5ml/kg KGW FCA i.m.
Tag 25	BE 3	20mg/kg KGW HSA-PSE i.v.
Tag 29	BE 4	20mg/kg KGW HSA-PSE i.v.
Tag 33	BE 5	20mg/kg KGW HSA-PSE + 0,5ml/kg KGW FCAi.m.
Tag 42 - 45		Entbluten durch Herzpunktion nach Narkose mit Evipan (Fa. Bayer, Leverkusen; 50mg/kg KGWi.v.)

2.6.2 Versuchsgruppen

Zur Untersuchung der Antikörperantwort nach Immunisierung mit Hapten- Carrierkomplexen wurden verschiedene Tiergruppen gebildet. Dabei kamen LPS und Levamisol als Immunmodulatoren und FCA als Adjuvans bei der Vorimmunisierung zur Anwendung.

Im Einzelnen wurden folgende Immunisierungsschemata angewandt:

PSE I

(6 Kontrollhühner und 6 dysgammaglobulinämische Hühner)

Tag	0	BE 0	20mg/kg KGW HSA-PSE i.v.
Tag	8	BE 1	
Tag	14	BE 2	
Tag	21	BE 3	
Tag	42	BE 4	5µg/kg KGW LPS i.v.
Tag	49	BE 4`	
Tag	56	BE 5	5µg/kg KGW LPS i.v.
Tag	63	BE 5`	
Tag	105	BE 6	5µg/kg KGW LPS i.v.
Tag	112	BE 6`	

PSE II

(6 dysgammaglobulinämische Hühner)

Tag	0	BE 0	20 mg/kg KGW HSA-PSE + 50 µg/kg KGW LPS i.v.
Tag	8	BE 1	
Tag	14	BE 2	
Tag	21	BE 3	

PSE III

(6 Kontrollhühner und 6 dysgammaglobulinämische Hühner)

Tag	0	BE-1	0,4µg/kg KGW HSA + 0,5ml/kg KGW FCA i.m.
Tag	7	BE 0	20mg/kg KGW HSA-PSE i.v.
Tag	15	BE 1	
Tag	21	BE 2	
Tag	28	BE 3	

PSE IV

(6 dysgammaglobulinämische Hühner)

Tag	0	BE-1	0,4µg/kg KGW HSA + 0,5ml/kg KGW FCA i.m.
Tag	7	BE 0	20mg/kg KGW HSA-PSE + 0,25mg/kg KGW Levamisol i.v.
Tag	15	BE 1	
Tag	21	BE 2	
Tag	28	BE 3	

2.6.3 Kaninchen

Um große Mengen Antiseren für die Entwicklung eines ELISA zur Verfügung zu haben und um einen Vergleich Säuger - Vogel anstellen zu können, wurden 3 Kaninchen in Anlehnung an 3 verschiedene, in der Literatur beschriebene Immunisierungsschemata immunisiert (Hunter and Lenz, 1981; Liu et al., 1985; Engvall and Perlmann, 1972).

Kaninchen X :

Tag	0	BE	0	700µg BSA-PSE i.m./s.c.
Tag	14	BE	1	
Tag	21			700µg BSA-PSE i.m./s.c.
Tag	28	BE	2	
Tag	42	BE	3	700µg BSA-PSE i.m./s.c.
Tag	56	BE	4	
Tag	63	BE	5	700µg BSA-PSE i.m./s.c.
Tag	77	BE	6	
Tag	98	BE	7	
Tag	119	BE	8	
Tag	148	BE	9	700µg/kg KGW BSA-PSE i.m./s.c.

Kaninchen Y :

Tag	0	BE	0	500µg BSA-PSE + 1ml FCA i.m./s.c.
Tag	14	BE	1	500µg BSA-PSE i.m./s.c.
Tag	28	BE	2	500µg BSA-PSE + 1ml FCA i.m./s.c.
Tag	42	BE	3	500µg BSA-PSE i.v.
Tag	56	BE	4	
Tag	63	BE	5	500µg BSA-PSE i.v.
Tag	77	BE	6	500µg BSA-PSE i.v.
Tag	98	BE	7	500µg BSA-PSE i.v.
Tag	119	BE	8	500µg BSA-PSE i.v.

Kaninchen Z :

Tag	0	BE	0	5mg BSA-PSE + 1ml FCA i.m./s.c.
Tag	14	BE	1	
Tag	28	BE	2	
Tag	42	BE	3	
Tag	56	BE	4	5mg BSA-PSE + 1ml FCA i.m./s.c.

7 Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Kaninchen unter Evipannarkose (40mg/kg KGW i.v.) durch Herzpunktion entblutet.

2.7 Affinitätschromatographie

Zur affinitätschromatographischen Reinigung der Seren wurde als Trägermatrix CNBr-aktivierte Sepharose 4B der Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden, verwendet.

2.7.1 Puffer für die Affinitätschromatographie

Kopplungspuffer

0,1 mol/l NaHCO_3 ; 0,5 mol/l NaCl ; pH 8,3

8,40g NaHCO_3

29,22g NaCl

ad 1000 ml Aqua bidest.

Acetatpuffer

0,1 mol/l CH_3COONa ; 0,5 mol/l NaCl ; pH 4,0

1,36g CH_3COONa

29,22g NaCl

5ml 100% CH_3COOH

ad 1000 ml Aqua bidest.

Startpuffer

0,1 mol/l PO_4^{3-} ; 0,25-0,5 mol/l NaCl; 5% Tween 80; pH 7,0

5,60g KH_2PO_4

21,00g Na_2HPO_4

14,61g NaCl

0,20g NaN_3

5,0ml Tween 80

ad 1000ml Aqua bidest.

Elutionspuffer (sauer)

0,1 mol/l Glycin-HCl; 0,5 mol/l NaCl; pH 2,5

7,50g Glycin

29,22g NaCl

ad 1000ml Aqua bidest.

(mit HCl auf pH 2,5 eingestellt)

Elutionspuffer (alkalisch)

0,5 mol/l NH_4OH pH 11,8

20 ml Ammoniaklösung (25%)

514 ml Aqua bidest.

Phosphatpuffer

0,5 mol/l PO_4^{3-} ; pH 7,2

2,01g KH_2PO_4

6,13g K_2HPO_4

ad 1000ml Aqua bidest.

2.7.2 Kopplung des Haptens an die Sepharose

Um Haptene an CNBr-aktivierte Sepharose zu koppeln, werden sie üblicherweise zuerst an Proteinträger gebunden (Hunter and Lenz, 1981). Dies wurde mit PSE-Eialbumin durchgeführt.

Da nach Axén et al. (1967) die Kopplung von Protein an CNBr-aktivierte Sepharose auf einer Bindung der primären Aminogruppen beruht und das verwendete Hapten eine solche Aminogruppe besitzt, wurde PSE auch direkt an die Sepharose

gekoppelt. Dazu hatte sich 1 μ mol PSE/ g Sepharose als geeignet erwiesen. 300 μ g PSE wurden hierzu in 10 ml Kopp-
lungspuffer gelöst und in ein silikonisiertes Rundkölbchen
gegeben. 1 g Sepharose wurde nach 20-minütigem Quellen in HCl
(0,1 mol/l) der PSE-Lösung zugegeben. Dann ließ man das Kölb-
chen in Schrägstellung 2 Stunden lang bei Raumtemperatur
rotieren. Nach diesem Inkubationsschritt wurde die Flüssig-
keit mit einer Wasserstrahlpumpe über eine Keramiknutsche
abgesaugt und das Gel mit ca. 10 ml Kopplungspuffer, der zum
Ausspülen des Kölbchens verwendet worden war, nachgewaschen.
Verbleibende freie Valenzen der Sepharose wurden in einem
weiteren Inkubationsschritt (2h bei Raumtemperatur unter
Rotation; s.o.) mit 1 mol/l Ethanolaminlösung blockiert.
Danach wurde die Flüssigkeit wieder abgesaugt und das Gel 5
mal abwechselnd mit Kopplungspuffer und Acetatpuffer nachge-
waschen. Die gekoppelte Sepharose wurde dann in Kopplungspuf-
fer mit 0,02% NaN_3 bei 4°C aufbewahrt.

2.7.3 Durchführung der Affinitätschromatographie

Die zu reinigenden Seren wurden über Nacht gegen Startpuffer
dialysiert. Nach 20 Minuten Zentrifugation bei 25000 g in der
Ultrazentrifuge wurde das Serum über ein Papierfilter gege-
ben. Das filtrierte Serum wurde langsam auf die gepackte
Säule, die zuvor mit 10 Säulenvolumina Startpuffer äqui-
libriert worden war, aufgetragen. Mit weiteren 10 Säulenvolu-
mina Startpuffer wurde nachgewaschen. Die anschließende Elu-
tion wurde entweder mit 0,5 mol/l NH_4OH oder mit dem sauren
Elutionspuffer pH 2,5 durchgeführt. Es wurden 12 - 15 Frak-
tionen zu je 1 ml aufgefangen, wobei sich bei der Elution mit
saurem Puffer eine sofortige Neutralisation mit TRIS an-
schließen mußte. Bei einer Wellenlänge von 280 nm wurden die
Extinktionen der einzelnen Fraktionen gemessen und die Frak-
tionen mit den höchsten Extinktionen wurden vereinigt. An-
schließend wurden die Fraktionsvereinigungen gegen Phosphat-
puffer pH 7,2 dialysiert. Die affinitätschromatographisch

gereinigten Antikörper wurden bei -20°C aufbewahrt. Sie dienten nach Zugabe in antikörperfreie Agammaseren als Standards für die ELISA- Tests.

2.8 Rocket - Immunelektrophorese

Die isotypspezifische quantitative Bestimmung der Immunglobuline bei den Standardseren und die Bestimmung der Gesamt-IgG-Konzentration der DYS-Seren wurden mit der Rocket-Immunelektrophorese nach Laurell (1966) durchgeführt.

2.8.1 Puffer und Lösungen für die Rocket-Immunelektrophorese

TRIS-Barbituratpuffer pH 8,6
112,00 g Diäthylbarbitursäure
221,50 g TRIS (Fa. Boehringer, Mannheim)
2,66 g Calciumlactat
3,25 g Natriumacid
ad 5000ml Aqua bidest.

Färbelösung

450 ml Ethanol (96%)
100 ml Essigsäure (99%)
450 ml Aquq bidest.
5 g Coomassie Brilliantblau R250

Entfärbelösung

250 ml Ethanol (96%)
100 ml Essigsäure (99%)
450 ml Aqua bidest.

2.8.2 Durchführung der Rocket-Immunelektrophorese

Mit 1:5 verdünntem TRIS-Barbituratpuffer wurde eine 1%ige Agarose L-Lösung (Fa. LKB, Bromma, Schweden) hergestellt. Mit 15 ml dieser Lösung wurde eine vorher ausgetestete geeignete Menge (ca. 300 μl) eines monospezifischen Antiserums ver-

mischt. Nach Ausgießen auf einer Glasplatte mit 10 X 10 cm Seitenlänge und Erstarren des Gels wurden 1,5 cm vom unteren Rand entfernt 15 Löcher ausgestanzt. In diese Löcher wurden jeweils 5 μ l der zu testenden Seren in verschiedenen Verdünnungen und als Standard verschiedene Verdünnungen eines Serums mit bekanntem Gehalt an IgG, IgM bzw. IgA einpipetiert. Als Laufpuffer diente der 1:4 verdünnte TRIS-Barbituratpuffer. Die Elektrophorese wurde bei einer Feldstärke von 1V/cm 10-16 Stunden lang durchgeführt. Die Immunglobulinmoleküle wanderten dabei als Anionen. Die entstehenden Präzipitate wurden durch 5 Minuten Färbung mit der Coomassie-Brillantblau-Lösung und anschließender 10-minütiger Entfärbung in der Entfärbelösung sichtbar gemacht. Da bei dieser Methode die Höhe der Präzipitatpeaks proportional der Immunglobulinkonzentration der Seren ist, wurde anhand der Werte der Standardseren mittels linearer Regression eine Eichgerade erstellt, an welcher die Immunglobulinkonzentrationen der Proben bestimmt wurden.

2.9. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Die isotypspezifische Bestimmung der Anti-PSE-Antikörper und Anti-HSA-Antikörper erfolgte mittels ELISA (Engvall and Perlmann, 1971). Dabei wurde die Methode des indirekten ELISA, wie bei Sparks und Ballow (1983) beschrieben, zur Bestimmung des Antikörpergehaltes gewählt. Da sich beim ELISA neben der Antikörperkonzentration auch die Antikörperaffinität auswirkt (Peterfy et al., 1983), wurden die Ergebnisse nicht in μ g/ml, sondern in ELISA-Einheiten angegeben, welche ein Maß für die biologische Wirksamkeit der Antikörper sind. Als Vergleichswerte dienten die affinitätschromatographisch gereinigten Standardseren, deren isotypspezifischer Antikörpergehalt zuvor in der Rocket-Immunelektrophorese gemessen worden war (s.o.). Eine ELISA-Einheit entspricht der Bindungsaktivität von 1 μ g Antikörpern der Standardseren.

Um die Spezifität der Antikörper gegen das Hapten nachzuwei-

sen, wurde der indirekte kompetitive ELISA nach Hunter und Lenz (1981) gewählt.

2.9.1 Puffer und Substratlösungen für den ELISA

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) pH 7,2

8,00 g NaCl

0,20 g KCl

1,44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

0,20 g KH_2PO_4

(0,5 ml Tween 20)

ad 1000 ml Aqua dest.

Phosphatpuffer 0,1 mol/l pH 5,0

15,350 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

0,287 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

0,200 g NaN_3

ad 1000 ml Aqua bidest.

Phosphatpuffer 0,1 mol/l pH 8,0

16,69 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

0,97 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

ad 1000 ml Aqua bidest.

Amino-methyl-propanol (AMP)-Puffer

100 ml alkaline buffer solution 221 (Fa. Sigma, St. Louis, USA)

900 ml Aqua bidest.

Na-Carbonat-Puffer 0,1 mol/l pH 9,6

8,37 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$

6,00 g NaHCO_3

0,20 g NaN_3

ad 1000 ml Aqua bidest.

Substratlösung I (für alkalische Phosphatase)

200 mg 4-Nitrophenylphosphat (Fa. Serva, Heidelberg)

100 ml AMP-Puffer (s.o.)

Substratlösung II (für Peroxidase)

80 mg 5-Aminosalicylsäure (Fa. Sigma, St.Louis, USA)

100 ml Aqua bidest (bei 70°C lösen)

(nach dem Abkühlen mit 0,1N NaOH auf pH 6,0 einstellen
und mit 0,05% H_2O_2 im Verhältnis 10 : 1 mischen)

2.9.2 Beschichtung der ELISA-Platten

Für den ELISA wurden Polystyrolplatten mit 96 Kavitäten verwendet (Immunoplate II, Fa. Nunc, Wiesbaden). HSA bzw. an Hämocyanin gekoppeltes PSE (HC-PSE) wurden mit Na-Carbonat-Puffer verdünnt. Hierbei hat sich eine Proteinkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ für das HSA bzw. 25 $\mu\text{g/ml}$ für das HC-PSE als geeignet erwiesen. Von dieser Verdünnung wurden 200 μl pro Kavität einpipettiert. Anschließend wurden die Platten 3 Stunden bei 37°C inkubiert und danach über Nacht bei 4°C aufbewahrt.

Da laut Hunter et al.(1982) bei Immunisierung mit PSE-Proteinkomplexen auch Antikörper gegen die Diazo-Bindungsstelle gebildet werden und diese auch bei einer mit PSE-Proteinkomplex beschichteten Platte mit erfaßt werden, wurde eine von Suter (1982) entwickelte Methode zur direkten Beschichtung von Polystyrolplatten mit Hapten in modifizierter Form verwendet.

Dazu wurden die Platten zuerst mit Glutaraldehyd aktiviert. Von einer 0,2%igen Glutaraldehydlösung in Phosphatpuffer pH 5 wurden 200 μl pro Kavität einpipettiert. Danach wurde 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden dann mit dem gleichen Puffer neunmal gewaschen. Das Hapten wurde in Phosphatpuffer pH 8 in einer Konzentration von 15 $\mu\text{g/ml}$ gelöst. Von dieser Lösung wurden 200 μl pro Kavität in die glutaraldehydaktivierten Platten einpipettiert und 3 Stunden

bei 37°C inkubiert. Bis zur Verwendung wurden die Platten bei 4°C aufbewahrt.

2.9.3 Durchführung des ELISA

Die direkt mit Hapten beschichteten Platten wurden vor Verwendung 1 Stunde lang mit 200 µl pro Kavität Ethanolaminlösung (0,1 mol/l in Phosphatpuffer pH 8,0) bei 37°C inkubiert, um noch freie Bindungsstellen abzublocken. Danach wurden sie wie die konventionell beschichteten Platten behandelt:

Zuerst wurden die Platten 3 mal mit PBS-Tween gewaschen. Flüssigkeitsreste wurden durch Ausklopfen entfernt. In die Kavitäten 3 - 12 wurden je 50 µl, in die Kavität 2 90 µl PBS-Tween vorgelegt. Kavität 1 blieb zur Null-Justierung des Photometers frei. Dann wurde in die Kavität 2 10 µl Serum einpipettiert, durch Schütteln vermischt und 50 µl in die nächste Kavität überpipettiert. Auf diese Weise wurde bis Kavität 12 in logarithmischen Zweierschritten verdünnt. Von der letzten Kavität wurden dann 50 µl verworfen. Die Platten wurden mit Parafilm (American Can Company, Greenwich, USA) abgedeckt und 90 Minuten bei 37°C unter Rotation inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween wurden in jede Kavität 100 µl an alkalische Phosphatase gekoppelte isotypspezifische Antikörper vom Kaninchen in einer Verdünnung von 1:500 (anti-IgG und -IgM) bzw. 1:200 (anti-IgA) einpipettiert. Als Verdünnungspuffer diente PBS-Tween. Für die Auswertung der Kaninchenserum stand an Peroxidase gekoppeltes Ziegen-Anti-Kaninchen-Immunglobulin der Fa. Paesel, Frankfurt, zur Verfügung, wovon jedoch nur 50 µl pro Kavität in einer Verdünnung von 1:1000 (in PBS-Tween) verwendet wurden.

Nach weiteren 90 Minuten Inkubation unter Rotation bei 37°C und anschließenden 3 Waschgängen mit PBS-Tween wurden pro Kavität 200 µl Substratlösung I für die Hühnerseren bzw. 100 µl Substratlösung II für die Kaninchenserum einpipettiert. Die nun ablaufende Farbreaktion wurde mit 50 µl NaOH (0,1 mol/l) pro Kavität nach 10 Minuten, bei IgA nach 15

Minuten abgestoppt. Die Farbintensität als Ausdruck der Antikörperaktivität wurde bei 405 nm (Alkalische Phosphatase) bzw. 492 nm (Peroxidase) in einem Titertek-Vertikalphotometer der Fa. Flow, Meckenheim, gemessen. Durch Endpunkttitration und Vergleich mit den Standardseren wurde der Antikörpergehalt bestimmt. Als Titer wurde der negative Logarithmus zur Basis 2 derjenigen Verdünnungsstufe gewählt, bei der die Extinktion 0,1 betrug. Lag dieser Wert zwischen zwei Verdünnungsstufen, so wurde durch Interpolation der genaue Wert bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit einem Computerprogramm (Caulfield and Shaffer, 1984) nach folgenden Formeln :

$$t = x - ((0,1 - L) : (H - L))$$

$$c = A \times 2^{(t - s)}$$

Dabei gilt:

t = Titer

H = Extinktion der Verdünnungsstufe, deren Wert gerade noch > 0,1 ist

L = Extinktion der ersten Verdünnungsstufe, deren Wert < 0,1 beträgt

A = Standardkonzentration

x = Verdünnungsstufe mit der Extinktion = L

s = Standardtiter

c = Konzentration der Probe

2.10 Statistik

Aus den Einzelwerten einer Meßwertreihe wurde das arithmetische Mittel ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (s) errechnet. Zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben auf signifikante Differenz wurde der Student's T-Test nach Sachs (1976) durchgeführt. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit < 0,05 galten als signifikant.

3. ERGEBNISSE

3.1 Kopplung des Haptens an verschiedene Trägerproteine
Vor der Kopplung von PSE an verschiedene Carrierproteine mußte dies zunächst wie oben beschrieben diazotiert werden. Die in Abb.2 dargestellte Verschiebung des Absorptionsmaximums von 260 nm des nicht diazotierten PSE zu 310 nm nach Ablauf der Reaktion gilt dabei als Nachweis einer vollständig abgelaufenen Diazotierung des Haptens.

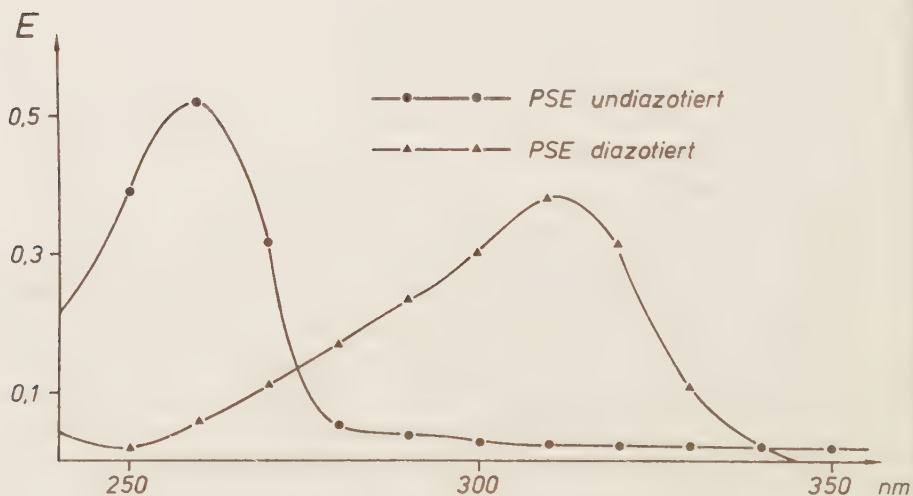


Abb.2: Verschiebung des UV-Spektrums von PSE nach Diazotierung mit NaNO_2 .

Zur Erzielung optimaler Diazoprodukte wurden durch Variieren der Hapten- bzw. der Trägerproteinkonzentration bei der Kopplung verschiedene Versuchsansätze durchgeführt (s.o.).

Wie aus Abb.3 am Beispiel von BSA-PSE ersichtlich ist, bestand dabei eine negative Korrelation zwischen der erreichten

Kopplungsrate (Moleküle PSE / Molekül BSA) und der Proteinkonzentration im Ansatz, während der Kopplungserfolg nahezu linear mit der Erhöhung der Haptenkonzentration anstieg. Entsprechende Zusammenhänge wurden auch bei den anderen Trägerproteinen festgestellt.

Im einzelnen wurden folgende Kopplungsergebnisse erzielt :

BGG :	1 - 3
BSA :	1 - 32
HC :	129 - 613
HSA :	17
OA :	8 - 42

gekoppelte PSE-Moleküle pro Trägerproteinmolekül.

Davon kamen folgende Kopplungsprodukte zur Anwendung :

BSA-PSE₁₈ wurde zur Immunisierung der Kaninchen,

HC-PSE₅₅₅ zur Beschichtung von ELISA-Platten,

HSA-PSE₁₇ zur Immunisierung der Hühner und

OA-PSE₂₃ zur Kopplung an BrCN-Sepharose 4B verwendet.

Wegen der sehr geringen Löslichkeit des Produktes konnten nur maximal 3 PSE-Moleküle an ein BGG-Molekül gekoppelt werden.

BGG-PSE fand deshalb keine Verwendung.

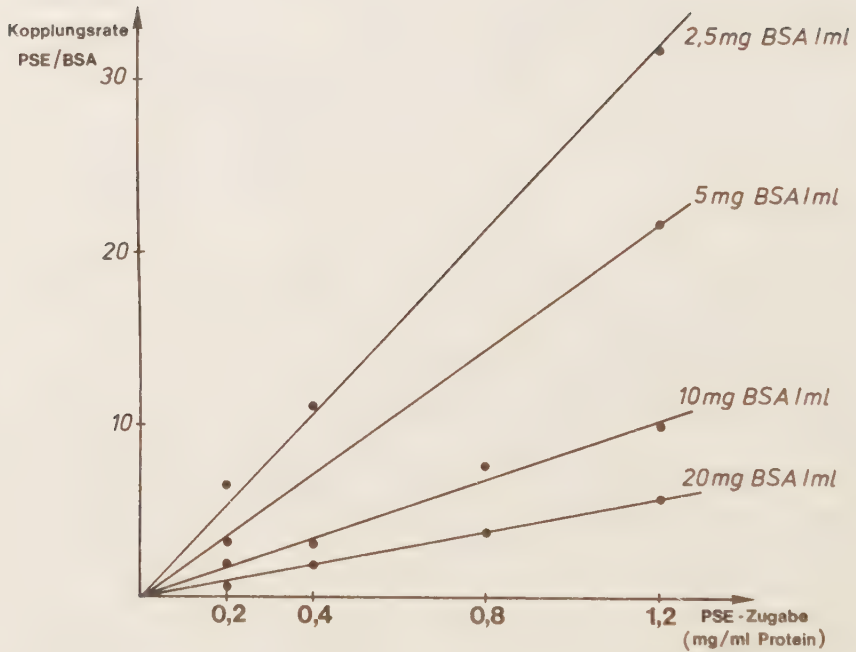


Abb.3: Abhängigkeit der Kopplungsrate von der Proteinkonzentration und von der Menge der PSE-Zugabe

3.2 Haptenspezifischer ELISA

Bei der Erarbeitung eines spezifischen ELISA sowohl zum Nachweis von haptenspezifischen Antikörpern als auch zum Nachweis von freiem Hapten wurden zunächst verschiedene Plattenbeschichtungen getestet. Dabei hatte in sich in Vorversuchen bei der Beschichtung mit HC-PSE eine Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ Beschichtungspuffer und bei der Beschichtung mit freiem PSE eine Konzentration von 15 $\mu\text{g/ml}$ Beschichtungspuffer als optimal erwiesen.

Im Vergleich beider Plattenbeschichtungen zeigte sich, daß mit PSE direktbeschichtete Platten bei Hühnerantikörpern eine doppelte und bei Kaninchenantikörpern eine vierfache Empfindlichkeit aufwiesen als mit HC-PSE beschichtete Platten, was sich bei verschiedenen Verdünnungen in einer Differenz von einer Titerstufe bei den Hühnerantikörpern (Abb.4) bzw. zwei Titerstufen bei den Kaninchenantikörpern (Abb.5) ausdrückte. Zum Nachweis der Spezifität der Antikörper wurde versucht, durch freies Hapten im Überstand die Antikörperaktivität zu hemmen. Abb.6 und 7 zeigen die Abhängigkeit der Hemmung von der Konzentration des freien Haptens. Bei Hühner-anti-PSE-IgG und bei Kaninchen-anti-PSE-Ig ist eine nahezu vollständige Hemmung möglich. 50% Hemmung wurden sowohl bei den Hühnerantikörpern der IgG-Klasse als auch bei den Kaninchenantikörpern zwischen 10^{-5} und 10^{-6}mol/l PSE erreicht.

Bei den Hühnerantikörpern der IgM-Klasse war eine vollständige Hemmung nicht möglich. 50% Hemmung wurden zwischen 10^{-2} und 10^{-3}mol/l PSE erreicht.

Gereinigte Hühnerantikörper der IgA-Klasse standen für die Hemmversuche nicht in ausreichender Menge zur Verfügung.

Titer

- 26 -

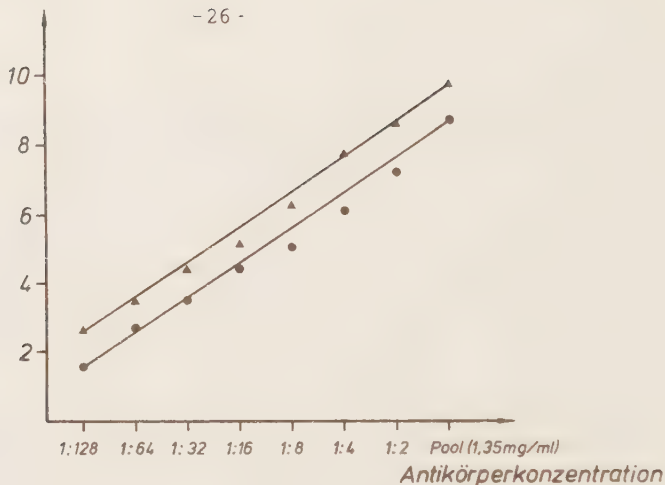


Abb. 4: Vergleich der Titerbildung verschiedener Verdünnungen affinitätschromatographisch gereinigter Hühner-anti-PSE-Antikörper (1,35 mg IgG/ml) auf unterschiedlich beschichteten ELISA-Platten

Titer

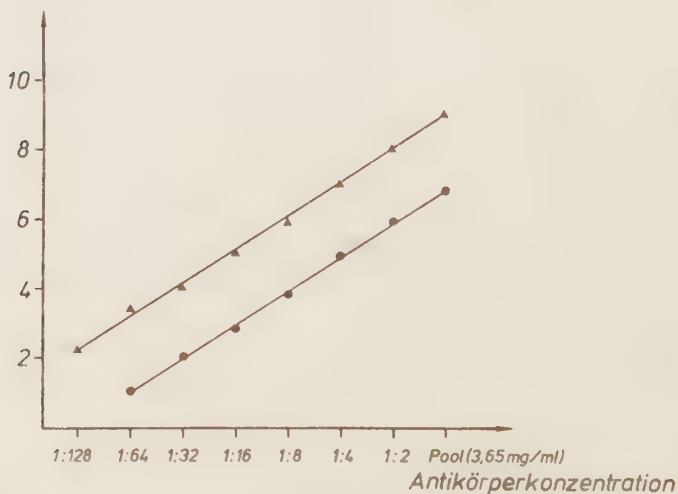


Abb. 5: Vergleich der Titerbildung verschiedener Verdünnungen affinitätschromatographisch gereinigter Kaninchen-anti-PSE-Antikörper (3,65 mg/ml) auf unterschiedlich beschichteten ELISA-Platten

▲ — PSE

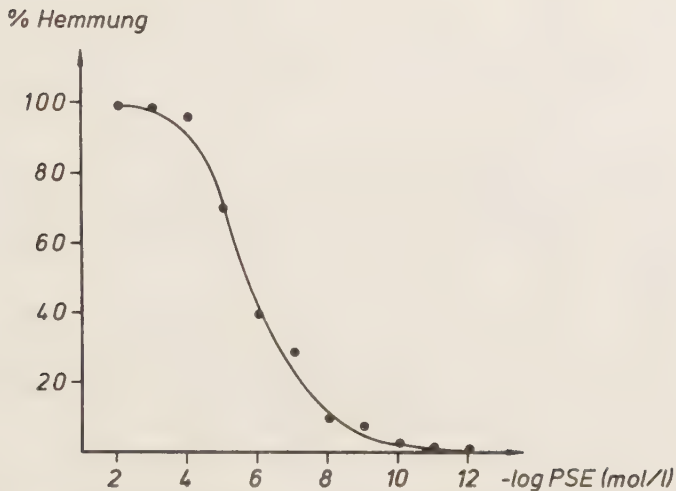


Abb. 6: Hemmung der Antikörperaktivität von Kaninchen-anti-PSE-Antikörpern durch verschiedene Konzentrationen von freiem PSE im Überstand

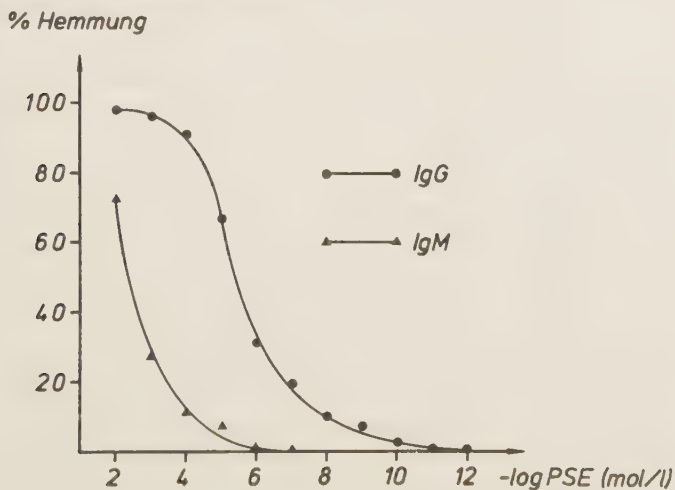


Abb. 7: Hemmung der Antikörperaktivität von Hühner-anti-PSE-IgG und -IgM durch verschiedene Konzentrationen von freiem PSE im Überstand

3.3 Antikörperantwort nach Immunisierung mit Hapten-Carrier-Komplexen

3.3.1 PSE-Standard (Abb.8-11; Tab.1-12 u. 46)

Bei dieser Gruppe sollten möglichst hohe Antikörpertiter erreicht werden, da die Antikörper nach affinitätschromatographischer Reinigung als Standards für die ELISA-Tests dienen sollten.

Durch ständige Boosterung und durch zweimalige Injektion von FCA wurden bei dieser Gruppe sowohl gegen PSE (Abb. 8 und 9; Tab. 1-6) als auch gegen HSA (Abb. 10 und 11; Tab. 7-12) die höchsten Titer überhaupt erreicht.

Dabei bildeten die Kontrolltiere sowohl gegen PSE als auch gegen den Carrier vornehmlich IgG-Antikörper, deren Titer jeweils am 21. Tag, also nach der ersten Boosterung merklich zunahmen und am 25. Tag, also nach FCA-Applikation sprunghaft anstiegen. Bei der Antikörperantwort gegen PSE zeigten diese Hühner deutlich höhere IgM-Titer als gegen den Carrier.

Bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern lagen vor allem Antikörper vom IgM-Isotyp vor. Wie bei den Kontrollen übertrafen auch hier die absoluten IgM-Antikörpertiter gegen das Hapten die gegen den Carrier gerichteten IgM-Titer. Die bei diesen Tieren feststellbare Produktion von IgG-Antikörpern war nur dezent. Dabei waren die gegen HSA gerichteten Antikörpertiter merklich höher als die PSE-spezifischen. Dies ist hauptsächlich auf das Tier 3416 zurückzuführen, das als einziges 14 Tage nach der Erstimmunisierung schon anti-HSA-IgG-Antikörper produzierte. Auch gegen PSE bildete dieses Huhn die höchsten IgG-Antikörperkonzentrationen (Tab.1 u. 7).

Auffällig waren die extrem hohen IgA-Titer der DYS-Tiere gegen PSE (Abb.8; Tab.3) und vor allem gegen HSA (Abb.10; Tab.9).

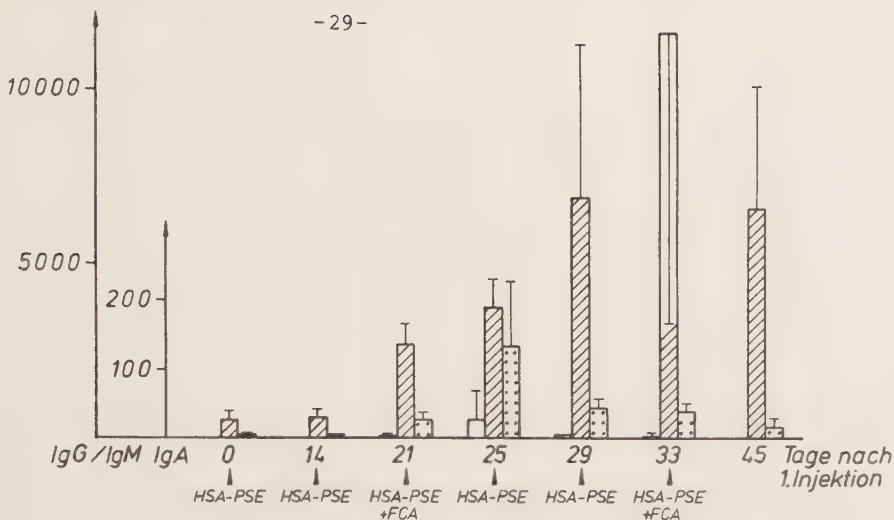


Abb.8: Anti-PSE-Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulinämischer UM-B19 Hühner (n=4) nach Immunisierung mit HSA-PSE und ständiger Boosterung mit HSA-PSE, zum Teil unter Einsatz von FCA

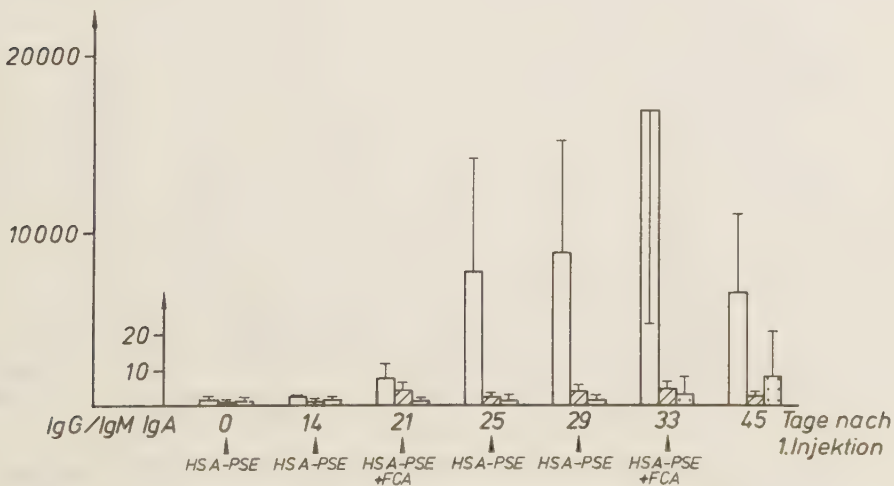


Abb.9: Anti-PSE-Titer (ELISA-Einheiten/ml) immunologisch intakter LSL-Hühner (n=4) nach Immunisierung mit HSA-PSE und ständiger Boosterung mit HSA-PSE, zum Teil unter Einsatz von FCA

ELISA-Einheiten/ml

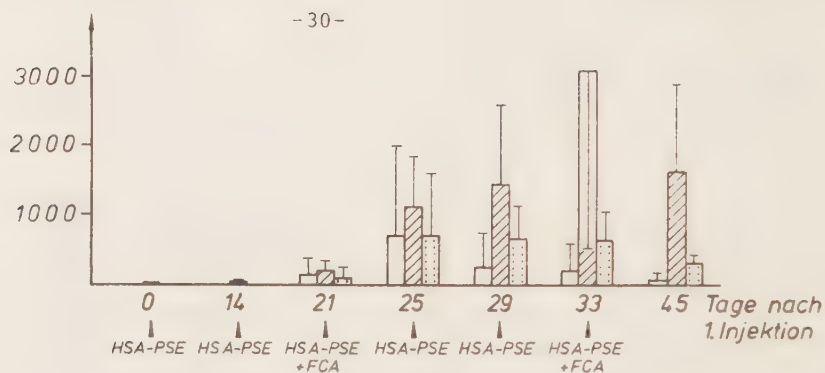


Abb.10: Anti-HSA-Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulinämischer UM-B19 Hühner (n=4) nach Immunisierung mit HSA-PSE und ständiger Boosterung mit HSA-PSE, zum Teil unter Einsatz von FCA

ELISA-Einheiten/ml

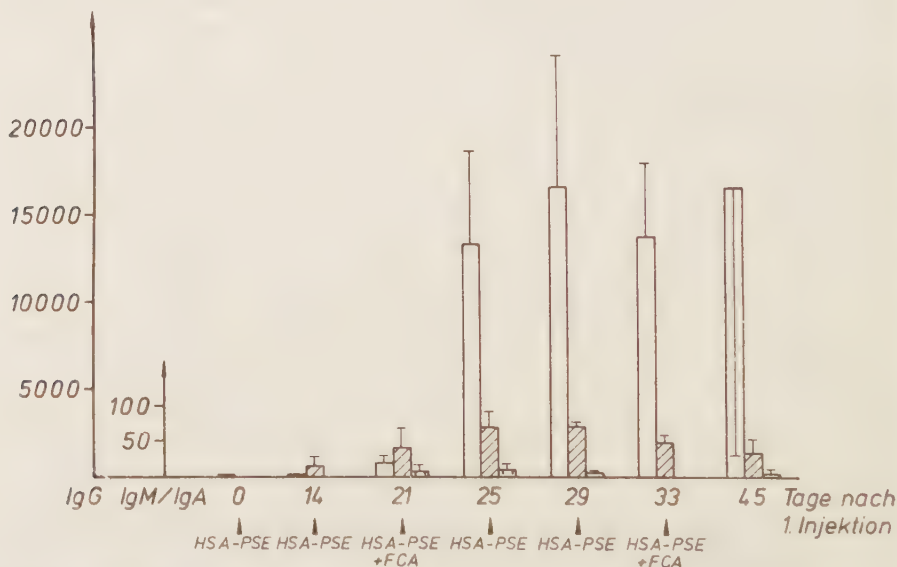


Abb.11: Anti-HSA-Titer (ELISA-Einheiten/ml) immunologisch intakter LSL-Hühner (n=4) nach Immunisierung mit HSA-PSE und ständiger Boosterung mit HSA-PSE, zum Teil unter Einsatz von FCA

3.3.2 PSE I (Abb.12-15; Tab.13-23 u. 47)

Bei dieser Gruppe wurde die Antikörperbildung nach Immunisierung mit 20 mg/kg KGW HSA-PSE ohne Adjuvans oder Immunmodulatoren untersucht. Außerdem sollte durch separate Injektion von LPS 6, 8 und 15 Wochen nach der Immunisierung versucht werden, bei DYS-Tieren eine IgG-Antikörperbildung zu induzieren.

Hier traten die geringsten Antikörpertiter gegen PSE und gegen HSA auf.

Von den DYS-Tieren wurden gegen PSE überhaupt keine und gegen HSA nur sehr geringe und kurzfristige IgG-Antikörpertiter bei der Hälfte der Tiere gebildet (Abb.14; Tab.18). Die Antikörperantwort dieser Tiere beschränkte sich hauptsächlich auf die IgM-Klasse (Abb.12 u. 14; Tab.13, 14, 18, 19 u. 20).

Die IgM-Antikörperwerte der DYS-Tiere erreichten gegen HSA am 8. Tag ihren Höhepunkt, um dann nach leichtem Absinken ein lang anhaltendes Plateau zu bilden. Erst nach mehrmaliger LPS-Applikation stiegen die IgM-Antikörperspiegel an den Tagen 105 und 112 wieder an. Die gegen PSE gerichteten IgM-Spiegel stiegen am 8. Tag nur gering an, um dann ebenfalls ein Plateau mit leichten Schwankungen nach LPS-Applikationen zu erreichen.

Die Kontrolltiere bildeten gegen PSE zunächst IgM- und IgG-Antikörper mit Peak am 8. Tag. Die IgG-Antikörpertiter fielen bis zum Tag 14 wieder stark ab, stiegen bis zum 42. Tag wieder langsam an und erreichten an den Tagen 105 und 112 nach mehrmaliger LPS-Verabreichung einen weiteren Höhepunkt. Die IgM-Antikörperwerte fielen bis zum 42. Tag wieder leicht ab, um ab diesem Zeitpunkt ein lang anhaltendes Plateau zu bilden. Gegen HSA bildeten die Kontrolltiere fast ausschließlich IgG-Antikörper mit einem deutlichen Peak am Tag 8. Danach sanken die IgG-Titer rasch ab und erreichten bei Versuchsende etwa doppelte Präimmunwerte (Abb.13 u. 15; Tab.15-17 u. 21-23). Das Tier 489 starb vor Versuchsende, so daß für die Tage 105 und 112 von diesem Tier keine Werte

vorliegen.

Beim Vergleich der DYS-Tiere mit den Kontrollen fiel auf, daß die anti-PSE-IgM-Antikörpertiter der Kontrolltiere die Werte der DYS-Tiere teilweise übertrafen und an den Tagen 8, 14 und 21 sogar höher waren als die entsprechenden IgG-Antikörperkonzentrationen.

Der Titeranstieg zwischen Tag 0 und Tag 8 war bei den DYS-Tieren für anti-PSE-IgA ($p < 0,01$), für anti-HSA-IgM und -IgA und bei den Kontrollen für anti-HSA-IgG und -IgA signifikant ($p < 0,05$). Für alle anderen Werte, vor allem auch für die Werte vor und nach LPS-Injektion konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

ELISA-Einheiten/ml

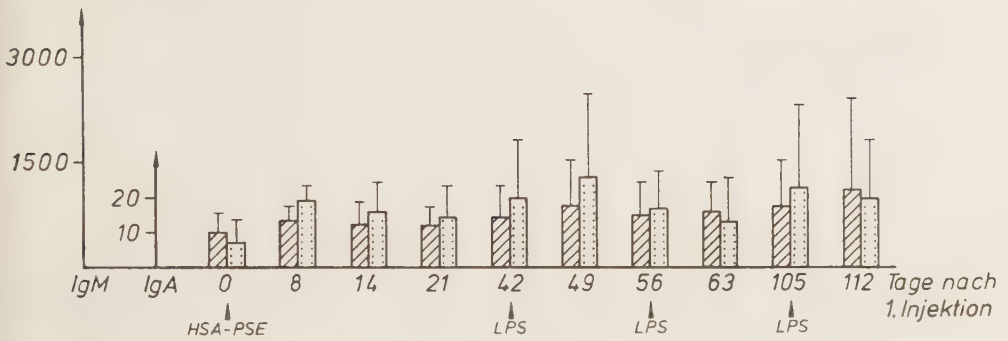


Abb.12: Anti-PSE-Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulinämischer UM-B19 Hühner (n=6) nach Immunisierung mit HSA-PSE und separater Injektion von LPS nach 6,8 und 15 Wochen

ELISA-Einheiten/ml

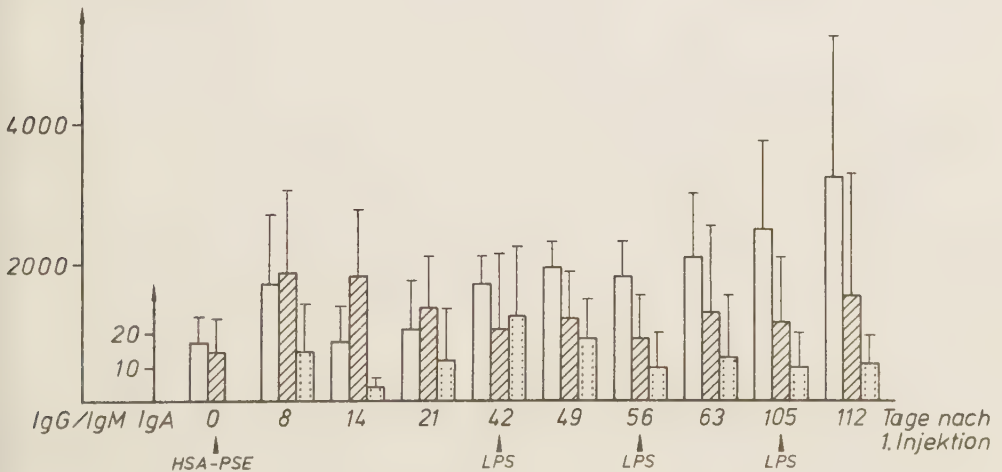


Abb.13: Anti-PSE-Titer (ELISA-Einheiten/ml) immunologisch intakter LSL-Hühner (n=6) nach Immunisierung mit HSA-PSE und separater Injektion von LPS nach 6, 8 und 15 Wochen

IgG

IgM

IgA

ELISA-Einheiten/ml

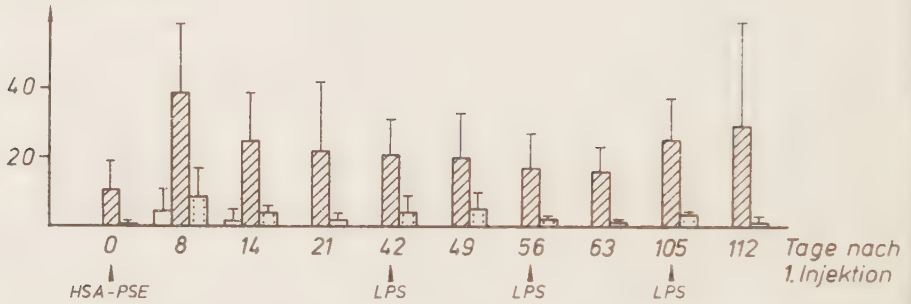


Abb.14: Anti-HSA-Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgamaglobulinämischer UM-B19 Hühner (n=6) nach Immunisierung mit HSA-PSE und separater Injektion von LPS nach 6, 8 und 15 Wochen

ELISA-Einheiten/ml

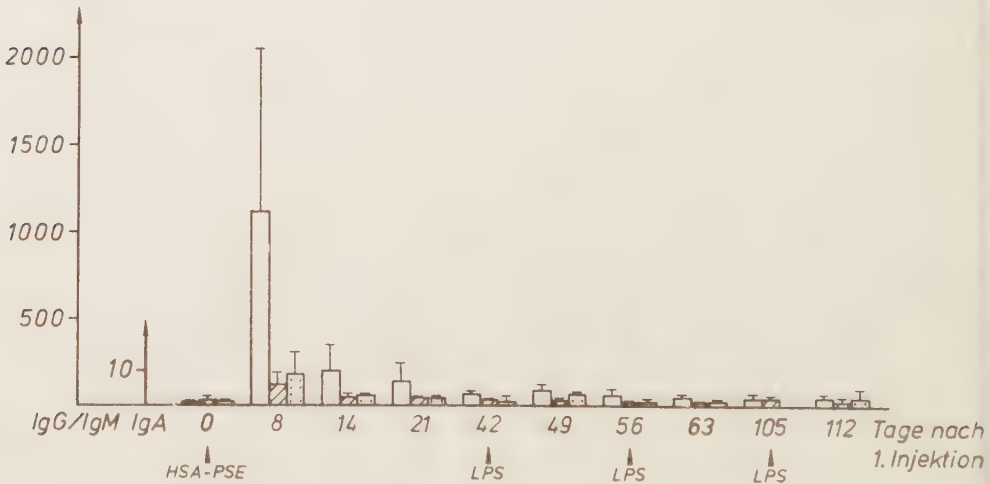


Abb.15: Anti-HSA-Titer (ELISA-Einheiten/ml) immunologisch intakter LSL-Hühner (n=6) nach Immunisierung mit HSA-PSE und separater Injektion von LPS nach 6, 8 und 15 Wochen

IgG

IgM

IgA

3.3.3 PSE II (Abb.16 u. 17; Tab.24-28 u. 48)

Bei dieser nur aus dysgammaglobulinämischen Hühnern bestehenden Gruppe sollte durch gleichzeitige Verabreichung von LPS und HSA-PSE versucht werden, eine IgG-Antikörperbildung zu induzieren.

Gegen PSE wurden dabei überhaupt keine Antikörper der IgG-Klasse produziert, während gegen HSA nur sporadisch sehr geringe Titer bei 5 Tieren auftraten (Abb.17; Tab.26).

Gegen PSE wurden allerdings hohe IgM- und geringe IgA-Titer mit Peak am 8.Tag erreicht (Abb.16; Tab.24 u. 25). Gegen HSA wurden dagegen nur geringe IgM-Titer ebenfalls mit Peak am Tag 8 und unbedeutende IgG- und IgA-Titer gebildet (Abb.17; Tab.26-28).

Der Unterschied zwischen den Präimmunwerten am Tag 0 und den Maximalwerten am Tag 8 war für anti-PSE-IgM ($p < 0,001$), für anti-PSE-IgA und anti-HSA-IgM signifikant ($p < 0,05$).

Beim Vergleich dieser Tiergruppe mit den dysgammaglobulinämischen Tieren der Gruppe PSE I fiel auf, daß die anti-PSE-IgM-Werte am Tag 8 (=Peak) signifikant ($p < 0,01$) höher lagen als die vergleichbaren Werte ohne gleichzeitige LPS-Injektion (vgl. Tab.13 u. 24).

Der prozentuale Anstieg vom Tag 0 (Präimmunwert = 100%) zum Tag 8 betrug bei den einzelnen Tieren für anti-PSE-IgM bei der Gruppe PSE I 88, 122, 157, 314, 200 und 133%, bei der Gruppe PSE II 598, 332, 566, 535, 507, und 445% und war somit bei der Gruppe PSE II signifikant höher ($p < 0,001$) als bei der Gruppe PSE I.

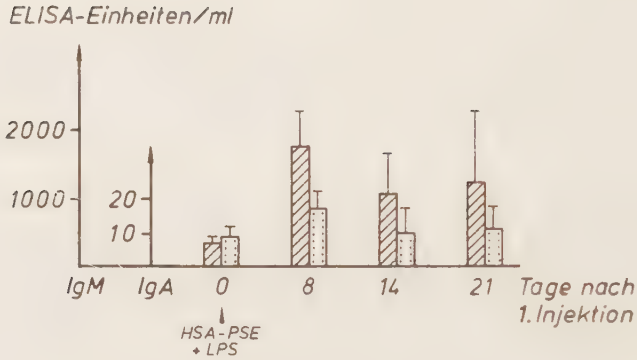


Abb.16: Anti-PSE-Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulinämischer UM-B19 Hühner (n=6) nach Immunisierung mit HSA-PSE und gleichzeitiger Injektion von LPS

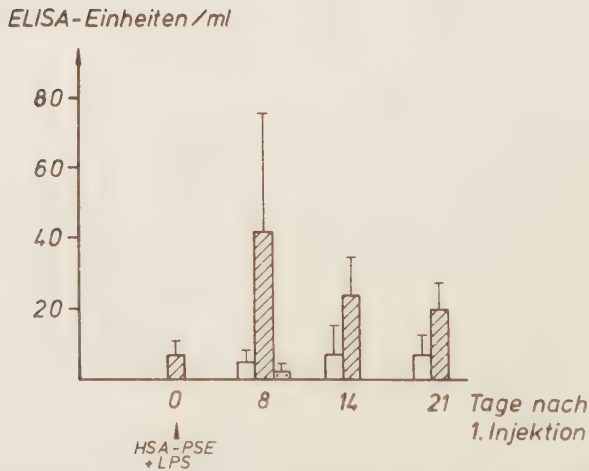


Abb.17: Anti-HSA-Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulinämischer UM-B19 Hühner (n=6) nach Immunisierung mit HSA-PSE und gleichzeitiger Injektion von LPS

 IgG

 IgM

 IgA

3.3.4 PSE III (Abb.18-21; Tab.29-39 u. 49)

Bei dieser Gruppe sollte der Einfluß einer Vorimmunisierung mit einer geringen Dosis Carrierprotein (0,4 µg/kg KGW), das zusammen mit FCA (0,5 ml/kg KGW) verabreicht wurde, auf die Bildung haptenspezifischer Antikörper untersucht werden.

Die dysgammaglobulinämischen Tiere reagierten auch hier hauptsächlich mit der Bildung von IgM-Antikörpern, die sowohl gegen das Hapten, als auch gegen den Carrier am 15. Tag nach der Vorimmunisierung ihren höchsten Wert erreichten. Während sie gegen PSE ab diesem Zeitpunkt ein Plateau bildeten, fielen die gegen HSA gerichteten IgM-Antikörper wieder merklich ab. Die absoluten Werte der gegen das Hapten gerichteten IgM-Titer übertrafen dabei die gegen HSA (Tab.29 u. 35).

Lediglich gegen HSA bildeten die DYS-Tiere meßbare IgA-Titer, während die IgA-Antikörpertiter gegen PSE die Präimmunwerte im allgemeinen nicht übertrafen (Tab.30 u. 36).

Drei der DYS-Tiere reagierten mit einer geringgradigen IgG-Produktion gegen HSA (Tab.34). Anti-PSE-IgG-Titer waren aber nicht nachweisbar.

Auch bei den Kontrolltieren erreichten die gegen das Hapten gerichteten IgM-Antikörper am Tag 15 ihren Höhepunkt und bildeten dann ein Plateau. Sie erreichten dabei beinahe die Werte der DYS-Tiere und übertrafen sogar die IgG-Werte der Kontrollen bis zum 21. Tag (Abb.19; Tab.32).

Ein deutlicher Anstieg der anti-PSE-IgG-Titer war bei diesen Tieren erst am Tag 28 festzustellen (Tab.31).

Gegen HSA reagierten die Kontrolltiere dagegen mit einer beinahe ausschließlichen Produktion von IgG-Antikörpern mit deutlichem Peak am Tag 15 und anschließendem raschen Abfall (Abb.21; Tab.37).

Der Anstieg von den Präimmunwerten zu den höchsten Werten war bei den IgM-Titern der DYS-Tiere und bei den haptenspezifischen IgG- und IgM-Titern der Kontrolltiere signifikant ($p < 0,01$).

Im Vergleich mit den nicht vorimmunisierten Tieren der Gruppe

PSE I zeigte sich, daß durch die Vorimmunisierung der Anstieg zwischen Präimmunwerten und höchsten Werten bei den hapten-spezifischen IgM-Titern der DYS-Tiere und IgG-Titern der Kontrolltiere signifikant ($p < 0,01$) höher war.

Bei den entsprechenden anti-HSA-Titern zeigte sich nur bei den DYS-Tieren ein signifikant höherer Anstieg ($p < 0,05$) der IgM-Werte.

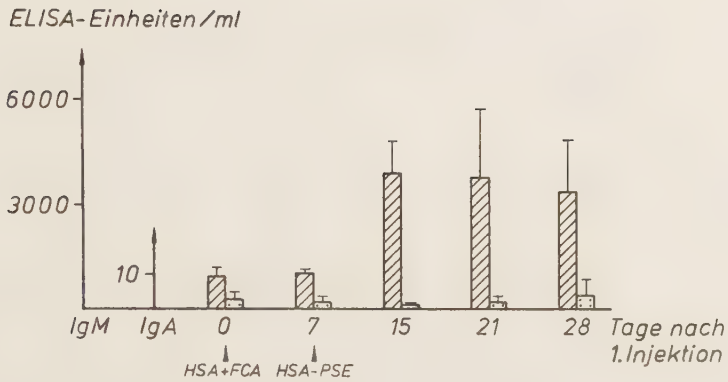


Abb.18: Anti-PSE-Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulinämischer UM-B19 Hühner (n=6) nach Vorimmunisierung mit HSA + FCA und Immunisierung mit HSA-PSE

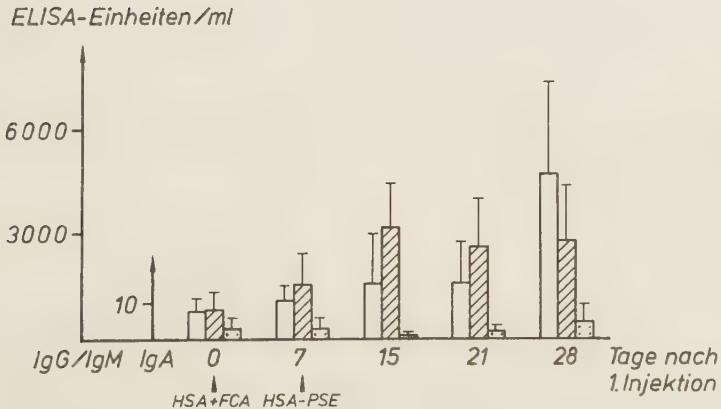


Abb.19: Anti-PSE-Titer (ELISA-Einheiten/ml) immunologisch intakter LSL-Hühner (n=6) nach Vorimmunisierung mit HSA + FCA und Immunisierung mit HSA-PSE

ELISA-Einheiten/ml

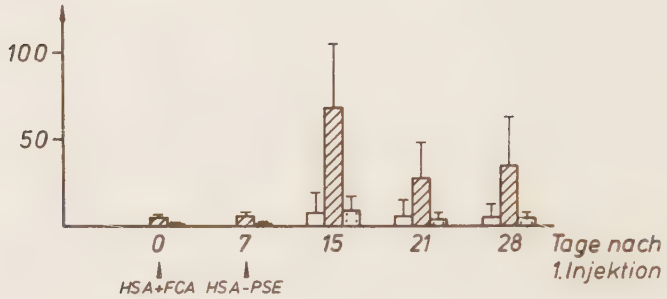


Abb.20: Anti-HSA-Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulinämischer UM-B19 Hühner (n=6) nach Vorimmunisierung mit HSA + FCA und Immunisierung mit HSA-PSE

ELISA-Einheiten/ml

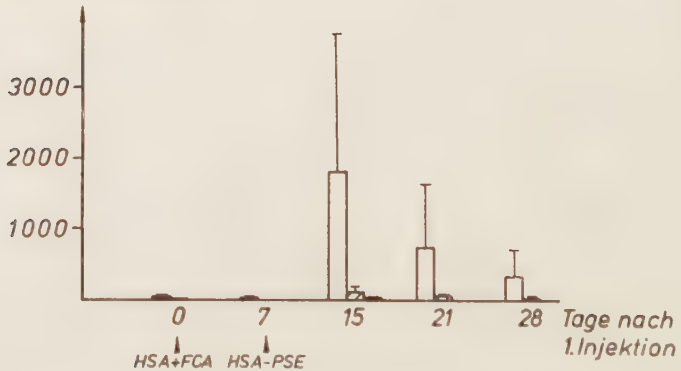


Abb.21: Anti-HSA-Titer (ELISA-Einheiten/ml) immunologisch intakter LSL-Hühner (n=6) nach Vorimmunisierung mit HSA + FCA und Immunisierung mit HSA-PSE

 IgG

 IgM

 IgA

3.3.5 PSE IV (Abb.22 u. 23; Tab.40-45 u. 50)

Zusätzlich zur HSA-Vorimmunisierung zusammen mit FCA sollte der Einfluß von Levamisol auf die Antikörperbildung bei DYS-Tieren untersucht werden.

Auch bei dieser Immunisierungsmethode konnten gegen PSE keine IgG-Antikörper nachgewiesen werden. Lediglich Tier 3491 reagierte am Tag 15 mit einer Produktion von 54 ELISA-Einheiten/ml (Tab.40).

Dagegen zeigten 4 der 6 Tiere ab dem 15. Tag IgG-Antikörperbildung gegen HSA, die jedoch keinesfalls die üblichen Werte von Kontrolltieren aus anderen Gruppen erreichten (Tab.43). Gegen PSE wurden geringere IgM-Titer erreicht als bei der vergleichbaren Gruppe ohne Levamisol (Tab.29 u. 41).

Der Anstieg von den Präimmuntitern zu den höchsten Werten am Tag 15 war für anti-PSE-IgM ($p < 0,05$), für anti-HSA-IgM ($p < 0,01$) und für anti-HSA-IgA ($p < 0,001$) signifikant.

Obwohl die absoluten anti-HSA-IgM-Werte (Tab.44) über denen der Gruppe ohne Levamisol lagen (Tab.35), war wegen der höheren Präimmuntiter der prozentuale Anstieg von den Präimmunwerten (= 100%) zu den Maximalwerten am Tag 15 bei der Gruppe PSE III (ohne Levamisol) signifikant höher ($p < 0,05$). Die Werte betrugen im einzelnen

bei der Gruppe PSE III: 4450, 1475, 157, 1025, 1160 u. 3900 %
und bei der Gruppe PSE IV: 467, 170, 1353, 869, 431 u. 717 %.

ELISA-Einheiten/ml

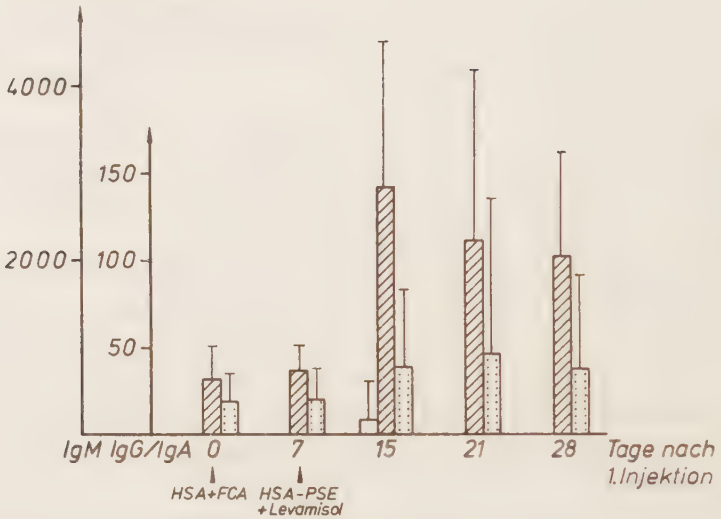


Abb. 22: Anti-PSE-Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulinämischer UM-B19 Hühner (n=6) nach Vorimmunisierung mit HSA + FCA und Immunisierung mit HSA-PSE + Levamisol

ELISA-Einheiten/ml

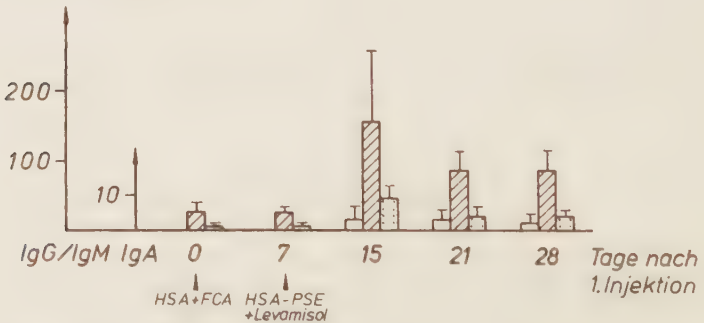


Abb. 23: Anti-HSA-Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulinämischer UM-B19 Hühner (n=6) nach Vorimmunisierung mit HSA + FCA und Immunisierung mit HSA-PSE + Levamisol



IgG



IgM



IgA

3.3.6 Kaninchen (Abb.24; Tab.51)

Am Rande dieser Arbeit wurde auch der Einfluß verschiedener Immunisierungsschemata auf die haptenspezifische Antikörperbildung bei Kaninchen untersucht.

Es zeigte sich, daß nur bei den Tieren, bei denen auch FCA verabreicht wurde, deutliche Antikörpertiter nachzuweisen waren.

Kaninchen X, das zwar häufig geboostert wurde, dem aber kein FCA appliziert worden war, zeigte nur eine geringe anti-PSE-Antikörperproduktion. Kaninchen Y, das mit geringen Antigen-dosen häufig immunisiert wurde, wobei zweimal FCA zum Einsatz kam, zeigte deutlich höhere Antikörpertiter als Kaninchen Z, das nur zweimal, aber mit der zehnfachen Antigendosis immunisiert wurde, wobei beide Male FCA mit verabreicht wurde.

Sowohl bei Kaninchen Y als auch bei Kaninchen Z kam es erst bei der zweiten FCA-Applikation zu einer überaus starken Antikörperbildung.

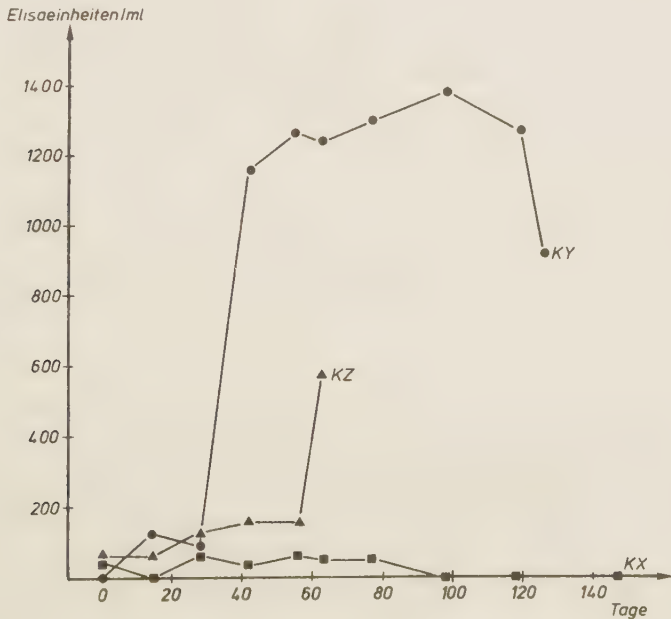


Abb.24: Anti-PSE-Titer (ELISA-Einheiten/ml) von Kaninchen nach Immunisierung mit BSA-PSE, zum Teil unter Einsatz von FCA

3.4 Gesamt-IgG-Konzentration bei den dysgammaglobulinämischen UM-B19-Hühnern (Tab.46-50)

Neben der Untersuchung der Antikörperantwort auf HSA und PSE wurden bei den Seren der DYS-Tiere auch die Gesamt-IgG-Konzentrationen mittels Rocket-Immunelektrophorese bestimmt. Wie aus den Tabellen 46 - 50 zu entnehmen ist, traten dabei sehr starke individuelle Unterschiede auf. Bei der Gruppe PSE-Standard zeigten zum Beispiel die Tiere 3341 und 3416 relativ hohe IgG-Konzentrationen, während bei den Tieren 3353 und 3385 so gut wie kein IgG nachweisbar war.

Daneben traten auch deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen auf, so zum Beispiel zwischen den Gruppen PSE I mit durchweg sehr geringen, zum Teil nicht nachweisbaren IgG-Spiegeln und der Gruppe PSE II, wo bei allen Tieren wesentlich höhere IgG-Werte gemessen wurden. Allerdings hatten 5 Tiere der Gruppe PSE II auch schon relativ hohe IgG-Konzentrationen vor der Immunisierung.

Bemerkenswert ist auch, daß die IgG-Werte, wenn sie gemessen werden konnten, im Verlauf ungefähr dem Verlauf der Antikörpertiter gegen PSE und HSA entsprachen.

4. DISKUSSION

Ein Ziel dieser Arbeit war es, ein empfindliches immunologisches Nachweissystem für Phosphorsäureester am Beispiel von PSE zu erarbeiten.

Da PSE kein Vollantigen sondern ein Hapten ist, mußte es zunächst mit einer geeigneten Methode an ein Trägerprotein gekoppelt werden. Um die für eine optimale Immunisierung erforderliche Anzahl von 10 - 30 Haptenmolekülen pro Trägerproteinmolekül (Pinckard, 1978) zu erreichen, mußte eine Kopplungsmethode gewählt werden, bei der sich die Kopplungsrate gut steuern läßt. Ein häufig angewandtes Verfahren um Haptene an Proteine zu binden, ist die Diazokopplung (Tabachnick and Sobotka, 1959; Schmid, 1962; Suttner et al., 1976). Bei dieser auch in der vorliegenden Arbeit angewandten Kopplungsmethode ließ sich, wie aus Abbildung 3 ersichtlich ist, durch Variation der Haptenzugabe das Kopplungsergebnis sehr genau vorausbestimmen. Als weitere Vorteile kommen hinzu, daß sich der Ablauf der Diazotierungsreaktion anhand der Verschiebung des Extinktionsmaximums von 260 nm auf 310 nm leicht verfolgen läßt (Abb. 2) und daß man die Kopplungsrate auf einfache Weise bestimmen kann (Fenton and Singer, 1971). Die Diazokopplung ist für Moleküle geeignet, die eine freie Aminogruppe besitzen. Bei Molekülen ohne eine freie Aminogruppe, müßte zuerst ein Spacer, d.h. ein Zwischenmolekül das eine solche Aminogruppe besitzt, eingefügt werden, z.B. Diaminohexan (Suter, 1982).

Als Detektionssystem zum Nachweis der Antikörper sollte der ELISA nach Engvall und Perlmann (1971) dienen. In Versuchen mit monoklonalen Antikörpern hat sich gezeigt, daß bei Immunisierung mit diazogekeoppelten Hapten-Proteinkomplexen nicht nur Antikörper gegen das Hapten und den Proteinträger, sondern auch gegen die Diazobindungsstelle gebildet werden (Hun-

ter and Lenz, 1981). Um die Erfassung dieser Antikörper zu vermeiden, galt es, eine andere als die allgemein übliche Beschichtung der Polystyrolplatten mit Protein-Haptenkomplexen zu finden. Suter (1981) beschreibt eine auf der vernetzenden Wirkung von Glutaraldehyd (Avrameas and Ternynck, 1968) beruhende Methode um Dinitrophenol-Diaminohexan in Form einer Schiff'schen Base kovalent an Polystyrolröhrchen zu binden. Neben einer erhöhten Spezifität soll daraus auch eine verbesserte Reproduzierbarkeit resultieren, da das Antigen nicht mehr nur physikalisch adsorbiert ist.

Da das in der vorliegenden Arbeit verwendete Hapten PSE schon eine freie Aminogruppe besitzt, erübrigte sich die Einfügung von Diaminohexan als Spacer.

Mit den derartig beschichteten ELISA-Platten wurden nur hapten-spezifische Antikörper erfaßt, was sich daran zeigte, daß sich die Antikörper-Aktivität durch freies Hapten im Verdünnungspuffer nahezu vollständig hemmen ließ. Eine Ausnahme bildeten die Hühner-Antikörper der IgM-Klasse. Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß zum einen Antikörper dieses Isotyps beim Huhn geringere Affinitäten haben als IgG-Antikörper (Ivanyj, 1977) und daß zum andern IgM-Antikörper größtenteils als Pentamere vorliegen, so daß bedeutend mehr Hapten notwendig ist, um alle Antigenbindungsstellen zu besetzen und so ein Haften des Moleküls auf der beschichteten Platte zu vermeiden.

Als ein weiterer Vorteil dieser Beschichtungsart erwies sich die größere Empfindlichkeit der mit PSE direkt beschichteten Platten (Abb. 4 u. 5), was mit den von Suter (1981) beschriebenen Ergebnissen übereinstimmt.

Zur quantitativen Bestimmung von freiem Hapten in unbekannten Proben stellt der competitive inhibition enzyme immunoassay (CIEIA) eine bewährte und häufig angewandte Methode dar (van Weeman and Schuurs, 1976; Hunter and Lenz, 1981; Hunter et al., 1982; Liu et al., 1985). Das Prinzip des CIEIA beruht

darauf, daß freies Hapten in der Probe und Hapten der soliden Phase um die Bindungsstelle am Antikörper konkurrieren. Je höher dabei die Konzentration von freiem Hapten in der Probe ist, desto geringer ist die im CIEIA nachweisbare Antikörperaktivität.

Typische Hemmkurven für PSE zeigen die Abbildung 6 und 7. Daraus geht hervor, daß mit IgG-Antikörpern vom Huhn freies PSE in einer Konzentration von 10^{-4} bis 10^{-8} mol/l, d.h. 30 µg/ml bis 3 ng/ml, sicher nachgewiesen werden kann.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit Kaninchen-Antikörpern erreicht, ohne daß eine isotypspezifische Differenzierung vorgenommen wurde. Aufgrund der langen Immunisierungsdauer kann man jedoch davon ausgehen, daß es sich dabei hauptsächlich um IgG-Antikörper handelte.

Die sehr viel geringere Empfindlichkeit der IgM-Antikörper vom Huhn wird aus Abbildung 7 ersichtlich. Die bedeutend höhere Haptenkonzentration, die nötig war, um 50% der IgM-Antikörperaktivität zu hemmen, ist zum einen auf die geringe Affinität und zum anderen auf die besondere Struktur der IgM-Antikörper zurückzuführen (s.o.). Die Ergebnisse mit Hühner-IgG-Antikörper zeigen aber, daß dieses Testsystem geeignet ist, PSE in äußerst geringer Konzentration zuverlässig nachzuweisen.

Ein Maß für die Toxizität von Phosphorsäureestern stellt die im Tierversuch ermittelte LD₅₀ dar. So beträgt z.B. für das Insektizid Parathion (E 605) die akute orale LD₅₀ bei der männlichen und weiblichen Ratte 3,6 - 14 mg/kg KGW und beim Pferd 5 mg/kg KGW (Wegler, 1970; Perkow, 1976; Matsumura, 1985).

Bei der Annahme, ein 500 kg schweres Pferd würde 10 l vergiftetes Wasser innerhalb kurzer Zeit aufnehmen, so müßte zum Erreichen der LD₅₀ in dem aufgenommenen Wasser eine Konzentration von 250 µg/ml vorliegen.

Die Nachweisgrenze der erarbeiteten Methode liegt mit 3 ng/ml weit unter dieser toxischen Konzentration.

Eine derartige Nachweismethode kann also als ausreichend empfindlich betrachtet werden, um Phosphorsäureester auch noch in subtoxischen Dosen sicher nachweisen zu können. Der Vorteil gegenüber gaschromatographischen Verfahren besteht darin, daß sie vom technischen Personal ohne großen Aufwand und schnell durchzuführen ist und daß die Ergebnisse einfach zu interpretieren sind.

Ein weiterer Aspekt für die Verwendung von Hühner-IgG-Antikörpern für ein geeignetes Nachweisverfahren ergibt sich daraus, daß immunisierte Legehennen spezifische IgG-Antikörper in den Dotter übertragen, wobei ähnliche Konzentrationen wie im Serum erreicht werden. Derartige Dotterantikörper können wenig kostenaufwendig in großer Menge produziert werden und sind relativ leicht zu isolieren (Lösch et al., 1986).

Neben der Erarbeitung eines haptenspezifischen ELISA zum Nachweis von PSE sollte bei dieser Arbeit die Antikörperantwort dysgammaglobulinämischer UM-B19-Hühner weiter charakterisiert werden.

Über die Ursache der erblichen Dysgammaglobulinämie der UM-B19-Hühnerlinie existieren, basierend auf Ergebnissen aus früheren Arbeiten (Lösch et al., 1981; Lösch et al., 1982; Kühlmann-Rabens et al., 1987) verschiedene Theorien :

- Gestörtes Verhältnis der T-Zell-Subpopulationen.
- Überschießende T-Suppression auf B_G-Zellen.
- Mangelnde T-Helferaktivität.
- Defekt der B-Zellrezeptoren zum Empfang des T-Helfer-Signals.
- Induktion einer isotypspezifischen immunologischen Toleranz auf B_G-Zellen aufgrund einer verzögerten Bursaentwicklung und damit verbundener erhöhter T-Suppression auf B_G-Zellen oder idiotypunabhängiger klonaler Eliminierung des B_G-Zellpools.

Zur weiteren Untersuchung dieses Immundefekts wurden dysgammaglobulinämische UM-B19-Hühner und immunologisch unauffällige Leghorn-Hühner als Kontrollen zum Teil unter Verwendung von Immunmodulatoren mit HSA-PSE immunisiert. Die vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Immunisierung gewonnenen Seren wurden wie in Material und Methoden beschrieben im indirekten ELISA auf Antikörperaktivität untersucht.

Zur Gewinnung hochtitriger Seren wurden einige Tiere unter zweimaliger Verwendung von FCA insgesamt sechsmal immunisiert (PSE-Standard). Die Wirkung von FCA wird auf eine Stimulierung der T-Helfer-Funktion zurückgeführt (Del Guercio, 1972). Bei Säugern wird eine starke Steigerung der Immunreaktion auf T-abhängige Antigene beschrieben (Allison and Davies 1971). Versuche mit immunologisch unauffälligen Hühnern zeigten eine Stimulierung der 7S-Ig Synthese auch ohne Zugabe von Antigen (Tam and Benedict, 1975). Versuche mit Hühnern, bei denen ein T-abhängiges Antigen (HSA) zusammen mit FCA verabreicht worden war, bewirkten bei Kontrollhühnern vor allem eine Steigerung der IgG-Antikörpersynthese und bei Dys-Tieren eine Steigerung der IgM- und IgA-Antikörpersynthese (Kühlmann-Rabens et al., 1987). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden mit FCA wie erwartet die höchsten Antikörpertiter sowohl gegen PSE als auch gegen HSA erreicht, wobei wie in früheren Untersuchungen DYS-Tiere hauptsächlich mit der Bildung von IgM- und Kontrolltiere mit der Bildung von IgG-Antikörpern reagierten. Auffällig war, daß die DYS-Tiere viermal und die Kontrolltiere zehnmal höhere IgM-Antikörpertiter gegen PSE aufwiesen als gegen HSA. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß gegen Haptene zum Teil natürliche Antikörper vorliegen, wie sie von Jormalainen und Mäkelä (1971) und von Trüby (1987) beschrieben wurden. Ebenso wird berichtet, daß antigene Determinanten die sich ständig wiederholen vor allem eine verstärkte IgM-Antwort bewirken (Cole et al., 1985). Die Beobachtung, daß die IgM-Antikörper-Antwort gegen PSE bedeutend stärker ausfiel als gegen HSA, wurde auch bei allen

anderen Versuchsgruppen gemacht. Bei allen Tieren der Gruppe PSE-Standard fiel die relativ geringe Primärantwort auf. Am Tag 14 waren außer bei den anti-HSA-IgM-Antikörpern der Kontrolltiere keine nennenswerten Titeranstiege zu beobachten. Erst am Tag 21 stiegen die Titer deutlich an, wobei bei den Kontrolltieren Antikörper der IgG-Klasse und bei Dys-Tieren Antikörper der IgM-Klasse überwogen. Auch vereinzelte IgG-Antikörpertiter bei den DYS-Tieren, vor allem bei Tier 3416, traten gegen HSA schon am Tag 21, also vor der 1. FCA-Applikation auf.

Ein kompensatorischer Einfluß von FCA auf eine möglicherweise fehlende B_G-spezifische T-Helfer-Aktivität bei den dysgamma-globulinämischen UM-B19-Hühnern konnte somit nicht nachgewiesen werden. Wie schon in früheren Untersuchungen (Kühlmann-Rabens et al, 1987) wurde das Immunglobulinmuster nämlich nicht verändert; schon vorhandene IgG-Antikörper-Aktivitäten wurden lediglich verstärkt. Ob die lang anhaltenden hohen Titer sowohl gegen PSE als auch gegen HSA auf die ständigen HSA-PSE-Immunisierungen oder auf eine FCA-Wirkung (Wanke, 1982; French et al, 1970) zurückzuführen ist, läßt sich bei diesem Immunisierungsschema nicht feststellen.

Um die Wirkung von bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) auf die Antikörperantwort bei DYS-Tieren zu untersuchen, wurde bei einer Gruppe (PSE I) LPS einige Wochen nach der Immunisierung mehrmals verabreicht, bei einer zweiten Gruppe (PSE II) wurde es gemeinsam mit HSA-PSE appliziert. Aufgrund des nachgewiesenen LPS-Rezeptors auf B-Zellen (Coutinho et al., 1974; Forni and Coutinho, 1978; Forni, 1985) hat LPS bei der Maus eine mitogene Wirkung auf B-Zellen vor allem bei mangelnder Stimulation wegen fehlender T-Helfer-Aktivität. Dieser Effekt wurde auch beim Huhn nachgewiesen (Hovi et al, 1978). Unter der Voraussetzung, daß die B-Zellen ansprechbar sind, eignet sich LPS bei Mäusen auch zur Durchbrechung einer immunologischen Toleranz, vor allem wenn diese durch eine

erhöhte T-Suppressor-Aktivität aufrecht erhalten wird (Chiller and Weigle, 1972, Louis et al, 1973, Fung and Köhler, 1980). Sollte eine erhöhte T-Suppression als Folge einer immunologischen Toleranz oder eine fehlende T-Helfer-Aktivität die Ursache der Dysgammaglobulinämie der UM-B19-Hühner sein, so wäre zu erwarten, daß diese Ursache durch Verabreichung von LPS kompensiert werden kann, sofern eine grundsätzliche Ansprechbarkeit der B_G-Zellen vorhanden ist. In früheren Untersuchungen konnte mit LPS unabhängig von einer gleichzeitigen Antigenverabreichung bei 79% der immunisierten DYS-Tiere eine verstärkte IgG-Synthese provoziert werden. Lediglich der zeitliche Verlauf des Auftretens von IgG-Antikörpern schien dabei von einer gleichzeitigen Antigeninjektion beeinflusst zu werden (Kühlmann-Rabens et al., 1987). Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Untersuchung nicht wiederholt werden. Die Verabreichung von LPS alleine (PSE I) bewirkte bei DYS-Tieren weder eine IgG-Antikörpersynthese gegen ein vorher verabreichtes Antigen, noch konnte die IgG-Serumkonzentration bei diesen Tieren erhöht werden. Dagegen scheinen dysgammaglobulinämische UM-B19-Hühner bei gleichzeitiger Verabreichung von Antigen und LPS mit einer geringgradigen Bildung von IgG-Antikörpern reagieren zu können. Bei gleichzeitiger LPS-Gabe fiel auch eine deutlich höhere Primärantwort gegen PSE auf, die sich in einem signifikant höheren prozentualen Anstieg der IgM-Titer und in signifikant höheren IgM-Antikörperwerten am Tag 8 ausdrückt. Dies könnte auf einen allgemeinen mitogenen Effekt von LPS zurückzuführen sein, der wohl auch für die Aufrechterhaltung nachweisbarer Antikörpertiter bei der Gruppe PSE I bis zum 112. Tag nach der Immunisierung verantwortlich ist. Die Gesamt-IgG-Spiegel konnten ebenfalls bei der Gruppe PSE II stimuliert werden. Ob die Reaktivität der PSE II-Gruppe auf die gleichzeitige Verabreichung von LPS und Antigen zurückzuführen ist oder durch die Erhöhung der LPS-Dosis von 5 auf 50 ug/kg Körpergewicht verursacht wurde bleibt ungeklärt, zumal

frühere Untersuchungen keine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen LPS und IgG-Synthese beim Huhn ergaben (Kühlmann-Rabens et al., 1987). Die Betrachtung der Serum-IgG-Spiegel dieser Gruppe legt darüberhinaus die Vermutung nahe, daß der Immundefekt nicht so stark ausgeprägt war, wie bei den DYS-Tieren der PSE I-Gruppe. Bis auf 1 Tier waren nämlich schon vor der Immunisierung deutliche Serum-IgG-Konzentrationen nachweisbar. Bei den Tieren mit den höchsten Gesamt-IgG-Konzentrationen traten auch anti-HSA-IgG-Titer auf, die jedoch bedeutend geringer waren als bei Kontrolltieren ohne LPS-Stimulation und als bei Dys-Tieren in früheren Untersuchungen. Die Ursache dieser Unterschiede zwischen den früheren und den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen könnte darauf zurückzuführen sein, daß durch die Kopplung von PSE an das HSA dieses derivatisiert wurde und seine antigenen Determinanten nicht mehr vollständig zugänglich waren. Dies zeigte sich auch darin, daß bei DYS-Tieren die anti-HSA-Antikörperantwort bei allen Gruppen deutlich geringer ausfiel als die anti-PSE-Antikörperantwort.

Bei der Untersuchung von haptensspezifischen Antikörperantworten kann durch Carrier-Vorimmunisierung sowohl die Primär- als auch die Sekundärantwort gesteigert werden, wobei Carrierspezifische T-Helferzellen haptensspezifische B-Zellen anregen (Katz et al., 1970; Segal et al., 1971). Die Konzentration des Carriers bei der Vorimmunisierung scheint dabei von entscheidender Bedeutung zu sein (Chan and Henry, 1976). Die empfohlene Konzentration beim Huhn liegt zwischen 0,2 und 2 µg Carrierprotein in FCA eine Woche vor der Immunisierung (Sarvas et al., 1974). In früheren Untersuchungen (Trüby, 1987) konnte durch Vorimmunisierung mit HSA bei DYS-Tieren eine Bildung von haptensspezifischen IgG-Antikörpern provoziert werden, die sogar Werte von Kontrolltieren erreichten. Dies wurde als Durchbrechung einer möglichen B_G-spezifischen Toleranz gewertet, zumal Huchet und Grandjon

(1985) ebenfalls durch Carrier-Vorimmunisierung eine haptenspezifische Toleranz bei Mäusen durchbrechen konnten. Auch in der vorliegenden Untersuchung ist ein Carrier-Effekt feststellbar. Die haptenspezifischen IgG-Antikörpertiter der Kontrollhühner und IgM-Antikörpertiter der dysgammaglobulinämischen UM-B19-Hühner zeigten eine deutliche Steigerung gegenüber der nicht vorimmunisierten Gruppe PSEI. Sollte eine isotypspezifische B_G-Toleranz die Ursache der Dysgammaglobulinämie der UM-B19-Hühnerlinie sein, so konnte sie mit der gewählten Methode nicht überwunden werden, da weder gegen PSE noch gegen HSA nennenswerte IgG-Antikörper gebildet wurden, lediglich bei 3 der 6 DYS-Tiere traten unbedeutende anti-HSA-IgG-Titer auf, die aber weit unter den von den Kontrolltieren erreichten Werten lagen. Außerdem lagen nur sehr geringe Gesamt-IgG-Spiegel vor. Es liegt auch hier die Vermutung nahe, daß nicht genügend ansprechbare B_G-Zellen vorhanden waren, was für eine klonale Eliminierung dieser Zellpopulation sprechen würde. Es wäre auch möglich, daß durch die gemeinsame Verabreichung von HSA und FCA im Gegensatz zu den Untersuchungen von Trüby (1987), bei denen nur HSA zur Vorimmunisierung injiziert wurde, durch die entstehenden Granulome eine verzögerte Antigenfreisetzung stattfand.

Die sehr geringe Antigendosis könnte zwar noch für die Steigerung der haptenspezifischen Antikörperantwort ansprechbarer Klone (B_M bei Dys-Tieren, B_G bei Kontrollen) ausreichend gewesen sein, nicht aber zur Durchbrechung einer Toleranz.

Eine weitere Möglichkeit in den Kooperationsmechanismus der Immunzellen einzugreifen, ist der Einsatz von Levamisol (Mulcahy and Quinn, 1986), welches eine thymosinähnliche Wirkung hat und damit gestörte Verhältnisse im T-Zell-Bereich zu regulieren vermag (Renoux and Renoux, 1977; Goldstein, 1978; Symoens et al., 1979).

In früheren Untersuchungen mit Levamisol ist es gelungen,

teilweise eine IgG-Synthese bei DYS-Tieren zu provozieren, wobei bei 50% der untersuchten Hühner normale Serumkonzentrationen erreicht wurden und 50% als "non-responder"-Tiere keine IgG-Bildung zeigten (Kühlmann-Rabens et al., 1987).

In der vorliegenden Arbeit konnten mit Hilfe von Levamisol keine deutlichen Unterschiede zur analogen Gruppe ohne Levamisol-Gabe (= PSE III) festgestellt werden. Lediglich die erhöhten IgA-Titer stimmen mit den früheren Arbeiten überein. Ob das vorübergehende Auftreten geringer IgG-Antikörpertiter gegen HSA als Levamisolwirkung betrachtet werden kann bleibt unklar, da ähnliche Titer auch bei der Gruppe PSE III (ohne Levamisol) auftraten und diese auch bei weitem nicht die Werte von immunologisch intakten Hühnern erreichten.

Auch der vorübergehende Anstieg von Gesamt-IgG war, wie in anderen Gruppen, im allgemeinen nur dann feststellbar, wenn schon am Tag der Erstimmunisierung IgG-Immunglobuline nachgewiesen werden konnten. Auch diese IgG-Spiegel erreichten bei weitem nicht Werte wie sie in vorherigen Untersuchungen festgestellt wurden (Kühlmann-Rabens et al., 1987). Eine Erklärung dafür könnte sein, daß es sich bei dieser Gruppe ausschließlich um solche Tiere gehandelt hat, die keinen ansprechbaren B_G-Zellpool besaßen, der nach dem Ausgleich einer eventuell erhöhten T-Suppression durch die Levamisol-Gabe hätte reagieren können. Auch bei anderen Tierarten sind "non-responder" beschrieben, die keine Reaktion auf Levamisol zeigen. Ebenso wäre es denkbar, daß die Wirkung von Levamisol durch das verabreichte FCA behindert wurde. Eine antagonistische Wirkung von FCA und Levamisol ist allerdings in der Literatur nicht bekannt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß

1. durch FCA die höchsten Titer erreicht wurden, wobei sich die Steigerung der Antikörperantwort nicht nur bei den Hühnern, sondern auch deutlich bei den Kaninchen zeigte;
2. LPS nur wenn es gemeinsam mit Antigen verabreicht wurde eine Steigerung der Antikörperantwort ohne Beeinflussung des Immunglobulinmusters bewirkte;
3. eine Carrier-Vorimmunisierung eine Steigerung der hapten-spezifischen Antikörperantwort zur Folge hatte;
4. Levamisol keinen Einfluß auf die Antikörperantwort zeigte;
5. ein sicheres Durchbrechen des Immundefekts der dysgamma-globulinämischen UM-B19-Hühner mit keiner der beschriebenen Immunisierungsmethoden möglich war.

Das vereinzelte Auftreten von IgG-Antikörpertitern bei dysgamma-globulinämischen Tieren deutet darauf hin, daß die B_G-Zellen dieser Hühner grundsätzlich zur IgG-Synthese befähigt sind. Die starken individuellen Schwankungen bei der Ausbildung der Titer und auch der Serumimmunglobulinspiegel (auch schon in früheren Untersuchungen) läßt aber deutliche Unterschiede in der Ausprägung des Immundefekts vermuten. Tiere wie 3416, mit relativ hohem Serum-IgG-Spiegel reagieren offensichtlich auch besser auf Immunisierung und Immunmodulatoren.

Als mögliche Ursache für das Auftreten der Dysgamma-globulinämie der UM-B19-Hühner wurde auch schon früher eine zufällige polyklonale Toleranzinduktion der B_G-Zellen in den ersten Lebenstagen mit den daraus resultierenden Veränderungen im T-Zellverhalten diskutiert (Kühlmann-Rabens et al., 1987). Dies wird darauf zurückgeführt, daß sich die bursalen B_G-Zellen

aufgrund einer verzögerten Bursaentwicklung der DYS-Tiere noch in einem stark tolerogenen Stadium befinden, während die gereiften B_M -Zellen schon in die Peripherie ausgewandert sind.

Gershwin et al. (1980) vermuten ebenfalls Bursaanomalien als mögliche Ursache des Immundefekts der UCD 140-Hühnerlinie, der in seinem Bild der Dysgammaglobulinämie der UM-B19-Linie ähnelt.

Von entscheidender Bedeutung für die graduelle Ausbildung des Defekts scheinen dabei Umwelteinflüsse beim Schlupf und in den ersten Lebenstagen zu sein. Durch Keimfreihaltung in der ersten Lebenswoche ließ sich nämlich die Dysgammaglobulinämie verhindern (Kühlmann-Rabens et al., 1987). Unterschiedliche Umwelteinflüsse beim Schlupf können auch für die starken Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen, die meist auch Schlupfgruppen waren, verantwortlich sein.

Neben einer Verzögerung der Bursaentwicklung scheint die Bursa fabricii der DYS-Tiere aber auch dauerhaft geschädigt zu sein. Sowohl bei UM-B19-Hühnern (Lösch and Hoffmann-Fezer, 1973), als auch bei Hühnern der UCD 140-Linie (Gershwin et al., 1980; Erickson et al., 1982) wurden morphologische Bursaveränderungen nachgewiesen. Die Bursa als Zelldifferenzierungsorgan ist aber von entscheidender Bedeutung für die Rekrutierung reifer B-Zellen nach klonaler Eliminierung aufgrund einer Toleranzinduktion. So konnten Hühner nach neonataler Toleranzinduktion und darauffolgender Bursektomie diese Toleranz nicht mehr überwinden, während nicht bursektomierte Tiere nach einigen Wochen zum Normalzustand zurückkehrten (Peterson et al., 1971). Eine unterschiedliche Ausbildung des Bursadefekts bei DYS-Tieren ist möglicherweise ebenfalls die Ursache für die unterschiedliche individuelle Ausprägung der Dysgammaglobulinämie in der vorliegenden und in früheren Untersuchungen.

Tiere mit geringgradigen Defekten können offensichtlich genügend reife B_G -Zellen zur Verfügung stellen, die daraufhin

durch Immunmodulatoren auch beim Bestehenbleiben von Störungen innerhalb der T-Zellpopulation reagieren.

Ähnliche Ergebnisse liegen auch von anderen Tierarten vor. So konnten idiotyptolerante Mäuse nur dann mit LPS stimuliert werden, wenn trotz vorhandener T-Suppression schon wieder genügend ansprechbare B-Zellen vorlagen (Fung and Köhler, 1980).

Unter Wertung aller bisher erarbeiteten Erkenntnisse über den Immundefekt der UM-B19-Hühnerlinie liegt die Vermutung nahe, daß es sich sowohl um eine immunologische Toleranz als auch um eine Störung der T-Zellpopulation (möglicherweise als Folge der Toleranzinduktion) handelt und daß im Gegensatz zu früheren Arbeiten bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Hühnern die Defekte so stark ausgeprägt waren, daß sie mit den angewandten Immunisierungsmethoden nicht überwunden werden konnten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Dysgammaglobulinämische UM-B19-Hühner und immunologisch intakte Leghorn-Hühner sowie Kaninchen wurden mit einem an Serumalbumin gekoppelten Phosphorsäureester immunisiert. Zur Untersuchung der Antikörperantwort dieser Tiere wurde ein haptenspezifisches ELISA-System entwickelt. Durch Zugabe von freiem Hapten in den Verdünnungspuffer des ELISA konnte das Hapten quantitativ bis zu einer Nachweisgrenze von 3 ng/ml erfaßt werden. Die Möglichkeit, mit dem Prinzip dieses Modells Insektizide auf Phosphorsäureesterbasis quantitativ nachzuweisen, wird diskutiert.

Gleichzeitig wurde versucht, mit Hilfe von Freund's komplettem Adjuvans sowie mit bakteriellem Lipopolysaccharid und mit Levamisol als Immunmodulatoren und durch Carrier-Vorimmunisierung in die Antikörperantwort dysgammaglobulinämischer UM-B19-Hühner einzugreifen. Dabei zeigte sich, daß das vorhandene Immunglobulinmuster mit keiner der angewandten Methoden verändert werden konnte, lediglich eine Verstärkung der Antikörperantwort wurde erzielt.

Als Ursache der erblichen Dysgammaglobulinämie der UM-B19-Hühnerlinie werden immunologische Toleranz infolge einer verzögerten Bursaentwicklung und eine möglicherweise dadurch bedingte Beeinflussung von T-Zellsubpopulationen diskutiert.

6. SUMMARY

Hapten specific antibodies against a phosphate ester

Dysgammaglobulinemic UM-B19 chickens, immunologically competent Leghorn chickens and rabbits were immunized with a phosphate ester coupled to serum albumin. In order to examine the antibody response of these animals a hapten specific ELISA system was developed. It was possible to determine the hapten quantitatively in concentrations as low as 3 ng/ml by addition of free hapten to the ELISA dilution buffer. The possibilities of using the basis of this model to quantitatively determine phosphate ester based insecticides was discussed.

It was attempted at the same time to influence the antibody response of dysgammaglobulinemic UM-B19 chickens through carrier preimmunization as well as the use of Freund's complete adjuvant, bacterial lipopolysaccharide and levamisole as immunomodulators. It was found that the immunoglobulin pattern was not altered by any of the methods used, however an increase of the strength of the response was noted.

The possibility that the etiology of the dysgammaglobulinemia of the UM-B19 chickens is based upon delayed bursa development, possibly causing an immunologic tolerance which may influence T-cell subpopulations was discussed.

7. TABELLEN

Tab. 1 Anti- PSE- IgG- Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulin- ämischer UM-B19-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und ständiger Boosterung mit HSA-PSE, zum Teil unter Einsatz von FCA.							
Tage nach 1. Injektion	0	14	21	25	29	33	45
Tier-Nr.							
3341	0	0	0	99	90	173	0
3353	0	0	0	95	67	0	0
3385	0	0	93	212	169	99	0
3416	0	0	69	1854	75	0	0
$\bar{x}$	0	0	41	565	100	68	0
s	0	0	48	861	47	84	0

Tab. 2 Anti- PSE- IgM- Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulin- ämischer UM-B19-Hühner nach Immunisierung mit PSE-HSA und ständiger Boosterung mit PSE-HSA, zum Teil unter Einsatz von FCA.							
Tage nach 1. Injektion	0	14	21	25	29	33	45
Tier-Nr.							
3341	901	717	2713	4468	4468	5735	6408
3353	199	297	2657	4169	12552	21257	10927
3385	507	876	3506	3732	8224	15778	6820
3416	384	578	2028	2675	2445	3784	2313
$\bar{x}$	498	617	2726	3761	6922	11639	6617
s	297	246	606	785	4452	8290	3521

Tab. 3

Anti- PSE- IgA- Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulinämischer UM-B19-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und ständiger Boosterung mit HSA-PSE, zum Teil unter Einsatz von FCA.

Tage nach l.Injektion	0	14	21	25	29	33	45
Tier-Nr.							
3341	3	3	56	266	56	70	3
3353	9	8	11	142	50	35	18
3385	6	4	28	79	42	21	35
3416	4	4	14	44	25	28	11
$\bar{x}$	6	5	27	133	43	39	17
s	3	2	21	93	13	22	14

Tab. 4

Anti- PSE- IgG- Titer (ELISA-Einheiten/ml) immunologisch intakter LSL-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und ständiger Boosterung mit HSA-PSE, zum Teil unter Einsatz von FCA.

Tage nach l.Injektion	0	14	21	25	29	33	45
Tier-Nr.							
475	234	470	1181	3250	5316	17881	3760
476	412	364	2330	9321	13181	31351	13181
477	435	387	1946	16116	14830	17035	4926
479	91	303	490	1742	1520	1385	3707
$\bar{x}$	293	381	1487	7607	8712	16913	6394
s	162	69	818	6550	6342	12255	4560

Tab. 5 Anti- PSE- IgM- Titer (ELISA-Einheiten/ml) immunologisch intakter LSL-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und ständiger Boosterung mit HSA-PSE, zum Teil unter Einsatz von FCA.							
Tage nach 1.Injektion	0	14	21	25	29	33	45
Tier-Nr.							
475	171	218	692	277	870	536	323
476	253	328	1443	779	1102	1385	633
477	115	157	628	368	707	1000	795
479	38	90	438	253	382	507	319
$\bar{x}$	144	198	800	419	765	857	518
s	91	101	442	245	303	418	236

Tab. 6 Anti- PSE IgA- Titer (ELISA-Einheiten/ml) immunologisch intakter LSL-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und ständiger Boosterung mit HSA-PSE, zum Teil unter Einsatz von FCA.							
Tage nach 1.Injektion	0	14	21	25	29	33	45
Tier-Nr.							
475	1	2	2	3	4	10	28
476	0	0	0	0	0	0	0
477	0	0	0	0	0	0	0
479	2	2	0	0	0	0	4
$\bar{x}$	1	1	1	1	1	3	8
s	1	1	1	2	2	5	13

Tab. 7

Anti- HSA- IgG- Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulin-
ämischer UM-B19-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und
ständiger Boosterung mit HSA-PSE, zum Teil unter Einsatz von
FCA.

Tage nach 1.Injektion	0	14	21	25	29	33	45
Tier-Nr.							
3341	0	0	54	98	54	17	25
3353	0	0	17	4	3	0	0
3385	0	0	22	35	0	0	0
3416	0	5	490	2676	1035	824	245
$\bar{x}$	0	1	146	703	273	210	68
s	0	3	230	1316	509	409	119

Tab. 8

Anti- HSA- IgM- Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulin-
ämischer UM-B19-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und
ständiger Boosterung mit HSA-PSE, zum Teil unter Einsatz von
FCA.

Tage nach 1.Injektion	0	14	21	25	29	33	45
Tier-Nr.							
3341	23	37	187	1222	1007	5694	3386
3353	13	19	400	2084	1042	1394	1310
3385	12	19	97	476	599	400	429
3416	12	49	179	779	3115	4923	1404
$\bar{x}$	15	31	216	1140	1441	3103	1632
s	5	15	129	700	1134	2598	1249

Tab. 9

Anti- HSA- IgA- Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulin-
ämischer UM-B19-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und
ständiger Boosterung mit HSA-PSE, zum Teil unter Einsatz von
FCA.

Tage nach l. Injektion	0	14	21	25	29	33	45
Tier-Nr.							
3341	3	0	23	175	110	394	255
3353	8	10	320	2037	1138	1018	509
3385	0	0	60	269	381	239	190
3416	2	15	58	309	1033	931	277
$\bar{x}$	3	6	115	698	666	646	308
s	3	8	138	895	499	387	139

Tab.10

Anti- HSA- IgG- Titer (ELISA-Einheiten/ml) immunologisch
intakter LSL-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und
ständiger Boosterung mit HSA-PSE, zum Teil unter Einsatz von
FCA.

Tage nach l. Injektion	0	14	21	25	29	33	45
Tier-Nr.							
475	12	106	779	19701	16225	20254	5897
476	7	2	89	6775	9064	11394	5776
477	12	173	1537	12127	27099	10705	16566
479	5	15	865	15138	13766	13088	38059
$\bar{x}$	9	74	818	13435	16539	13860	16575
s	4	81	592	5423	7641	4379	15190

Tab.11

Anti- HSA- IgM- Titer (ELISA-Einheiten/ml) immunologisch intakter LSL-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und ständiger Boosterung mit HSA-PSE, zum Teil unter Einsatz von FCA.

Tage nach 1.Injektion	0	14	21	25	29	33	45
Tier-Nr.							
475	13	12	19	42	72	59	56
476	8	5	17	75	67	42	15
477	3	9	58	69	82	62	24
479	3	42	79	103	67	42	51
$\bar{x}$	7	17	43	72	72	51	37
s	5	17	30	25	7	11	20

Tab.12

Anti- HSA- IgA- Titer (ELISA-Einheiten/ml) immunologisch intakter LSL-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und ständiger Boosterung mit HSA-PSE, zum Teil unter Einsatz von FCA.

Tage nach 1.Injektion	0	14	21	25	29	33	45
Tier-Nr.							
475	0	0	0	0	0	2	13
476	0	0	0	17	0	0	0
477	0	0	10	0	0	0	0
479	0	0	20	20	11	2	0
$\bar{x}$	0	0	8	9	3	1	3
s	0	0	10	11	6	1	7

Tab.13

Anti- PSE- IgM- Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulin-
ämischer UM-B19-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und
separater Injektion von LPS nach 6, 8 und 15 Wochen.

Tage nach 1. Injektion	0	8	14	21	42	49	56	63	105	112
Tier-Nr.										
3253	876	779	559	620	747	1126	933	1434	807	747
3315	555	678	590	536	521	435	435	493	369	337
3410	727	1141	1274	1141	1647	2173	1647	1292	2173	3837
3411	178	559	283	406	473	473	496	595	603	473
3414	178	356	310	310	384	483	429	384	543	514
3421	438	582	637	566	603	555	543	603	758	853
$\bar{x}$	492	683	609	597	729	874	747	800	876	1127
s	285	265	358	290	466	687	479	445	655	1341

Tab.14

Anti- PSE- IgA- Titer (ELISA- Einheiten/ml) dysgammaglobulin-
ämischer UM-B19- Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und
separater Injektion von LPS nach 6, 8 und 15 Wochen.

Tage nach 1. Injektion	0	8	14	21	42	49	56	63	105	112
Tier-Nr.										
3253	18	23	21	28	18	70	22	0	0	0
3315	0	12	0	0	0	0	0	0	0	6
3410	9	26	19	16	49	35	25	28	55	35
3411	5	18	21	10	14	15	20	14	28	39
3414	7	15	11	8	9	9	8	9	9	9
3421	0	22	21	19	29	29	29	29	47	29
$\bar{x}$	7	19	16	14	20	26	17	13	23	20
s	7	5	9	10	17	25	11	13	24	17

Tab.15 Anti- PSE- IgG- Titer (ELISA-Einheiten/ml) immunologisch intakter LSL-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und separater Injektion von LPS nach 6, 8 und 15 Wochen.										
Tage nach l.Injektion	0	8	14	21	42	49	56	63	105	112
Tier-Nr.										
453	1368	1932	966	1080	1465	2071	1614	1742	1829	1829
456	940	2969	1880	379	1946	1946	1465	2266	2929	3484
462	966	2298	1015	1625	1946	1893	1110	1232	732	616
471	1065	2129	494	2129	2187	2463	1742	1790	3919	4926
489	335	376	447	532	1065	1946	2463	3484	-	-
490	366	518	409	409	1603	1357	2379	2015	3205	5390
-										
x	840	1704	869	1026	1702	1946	1796	2088	2523	3249
s	409	1035	563	724	406	356	529	765	1252	2025

Tab.16 Anti- PSE- IgM- Titer (ELISA-Einheiten/ml) immunologisch intakter LSL-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und separater Injektion von LPS nach 6, 8 und 15 Wochen.										
Tage nach l.Injektion	0	8	14	21	42	49	56	63	105	112
Tier-Nr.										
453	1240	1558	1424	1240	818	907	1197	1181	1283	1283
456	1414	4141	2828	2250	3204	1602	1347	1905	2694	4531
462	196	812	2789	742	310	279	235	310	253	178
471	737	2028	973	2219	753	1028	432	374	1141	1141
489	507	1802	2158	1274	1014	2329	1802	3506	-	-
490	168	847	510	400	225	1141	285	451	403	570
-										
x	710	1865	1780	1354	1054	1214	883	1288	1155	1541
s	525	1221	964	756	1096	693	654	1249	970	1730

Tab.17

Anti- PSE- IgA- Titer (ELISA-Einheiten/ml) immunologisch intakter LSL-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und separater Injektion von LPS nach 6, 8 und 15 Wochen.

Tage nach 1.Injektion	0	8	14	21	42	49	56	63	105	112
Tier-Nr.										
453	1	42	5	42	9	16	6	0	0	6
456	0	13	7	2	17	16	14	20	24	21
462	0	19	0	7	0	0	0	0	0	0
471	0	6	1	2	53	11	0	11	16	9
489	0	1	3	4	33	33	17	14	-	-
490	0	3	5	12	40	29	24	33	10	17
$\bar{x}$	0	14	4	12	25	18	10	13	10	11
s	0	15	3	15	20	12	10	13	10	8

Tab.18

Anti- HSA- IgG- Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulinämischer UM-B19-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und separater Injektion von LPS nach 6, 8 und 15 Wochen.

Tage nach 1.Injektion	0	8	14	21	42	49	56	63	105	112
Tier-Nr.										
3253	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3315	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3410	0	15	6	0	0	0	0	0	0	0
3411	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0
3414	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3421	0	8	5	0	0	0	0	0	0	0
$\bar{x}$	0	5	2	0	0	0	0	0	0	0
s	0	6	3	0	0	0	0	0	0	0

Tab.19 Anti- HSA- IgM- Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulin- ämischer UM-B19-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und separater Injektion von LPS nach 6, 8 und 15 Wochen.										
Tage nach 1.Injektion	0	8	14	21	42	49	56	63	105	112
Tier-Nr.										
3253	9	31	20	16	16	20	13	17	31	19
3315	26	69	53	61	31	18	12	20	12	14
3410	13	59	21	15	35	46	36	27	46	91
3411	8	21	14	16	15	11	17	12	19	15
3414	7	30	26	11	12	11	12	11	24	18
3421	9	24	16	10	15	15	10	9	19	18
$\bar{x}$	12	39	25	22	21	20	17	16	25	29
s	7	20	14	20	10	13	10	7	12	30

Tab.20 Anti- HSA- IgA- Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulin- ämischer UM-B19-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und separater Injektion von LPS nach 6, 8 und 15 Wochen.										
Tage nach 1.Injektion	0	8	14	21	42	49	56	63	105	112
Tier-Nr.										
3253	1	6	7	4	5	11	3	3	4	1
3315	0	7	3	4	13	13	0	0	1	0
3410	0	10	3	2	3	3	2	2	4	4
3411	2	5	4	1	3	3	2	1	3	2
3414	0	25	6	2	0	0	1	1	2	0
3421	0	3	2	0	2	2	1	1	1	1
$\bar{x}$	1	9	4	2	4	5	2	1	3	1
s	1	8	2	2	5	5	1	1	1	2

Tab.21

Anti- HSA- IgG- Titer (ELISA-Einheiten/ml) immunologisch intakter LSL-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und separater Injektion von LPS nach 6, 8 und 15 Wochen.

Tage nach 1.Injektion	0	8	14	21	42	49	56	63	105	112
Tier-Nr.										
453	6	1301	266	125	44	48	44	29	6	51
456	12	1945	486	101	39	42	21	33	27	34
462	12	669	125	100	47	73	54	60	19	17
471	27	2445	167	376	122	183	125	54	86	77
489	21	270	94	94	50	84	100	91	-	-
490	14	63	63	45	56	51	41	39	22	10
$\bar{x}$	15	1116	200	140	60	80	64	51	32	38
s	7	950	157	119	31	53	40	23	31	27

Tab.22

Anti- HSA- IgM- Titer (ELISA-Einheiten/ml) immunologisch intakter LSL-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und separater Injektion von LPS nach 6, 8 und 15 Wochen.

Tage nach 1.Injektion	0	8	14	21	42	49	56	63	105	112
Tier-Nr.										
453	60	72	56	50	41	45	44	40	52	64
456	53	266	94	63	40	28	22	20	37	28
462	14	27	70	23	19	39	26	26	37	22
471	13	155	50	51	16	31	9	11	14	5
489	12	29	21	33	13	21	14	37	-	-
490	5	34	35	48	13	10	8	10	10	12
$\bar{x}$	26	97	54	45	24	29	21	24	30	26
s	24	96	26	14	13	13	14	13	18	23

Tab.23

Anti- HSA- IgA- Titer (ELISA-Einheiten/ml) immunologisch intakter LSL-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und separater Injektion von LPS nach 6, 8 und 15 Wochen.

Tage nach l. Injektion	0	8	14	21	42	49	56	63	105	112
Tier-Nr.										
453	2	9	4	4	0	4	0	0	0	7
456	2	22	5	2	2	2	0	0	2	2
462	2	4	3	2	0	4	0	0	0	0
471	0	13	3	3	0	3	0	0	0	0
489	0	5	2	0	2	2	2	2	-	-
490	2	2	3	0	4	2	2	2	0	0
$\bar{x}$	1	9	3	2	1	3	1	1	0	2
s	1	7	1	2	2	1	1	1	1	3

Tab.24

Anti- PSE- IgM- Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulinämischer UM-B19-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und gleichzeitiger Injektion von LPS.

Tage nach l. Injektion	0	8	14	21
Tier-Nr.				
3510	426	2549	2173	3294
3512	543	1802	1014	1240
3518	358	2028	697	532
3519	344	1840	774	688
3532	200	1014	1133	926
3533	305	1357	570	678
$\bar{x}$	363	1765	1060	1226
s	115	533	583	1043

Tab.25

Anti- PSE- IgA- Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulin-
ämischer UM-B19-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und
gleichzeitiger Injektion von LPS.

Tage nach l. Injektion	0	8	14	21
Tier-Nr.				
3510	4	15	8	9
3512	11	21	11	11
3518	10	11	7	10
3519	11	24	20	20
3532	6	12	0	0
3533	13	18	13	14
$\bar{x}$	9	17	10	11
s	3	5	7	7

Tab.26

Anti- HSA- IgG- Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulin-
ämischer UM-B19-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und
gleichzeitiger Injektion von LPS.

Tage nach l. Injektion	0	8	14	21
Tier-Nr.				
3510	0	5	0	0
3512	0	0	0	0
3518	0	12	11	8
3519	0	0	0	7
3532	0	6	22	14
3533	0	5	6	14
$\bar{x}$	0	5	7	7
s	0	4	9	6

Tab.27				
Anti- HSA- IgM- Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulin- ämischer UM-B19-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und gleichzeitiger Injektion von LPS.				
Tage nach 1.Injektion	0	8	14	21
Tier-Nr.				
3510	7	41	37	28
3512	7	29	14	14
3518	4	109	37	14
3519	6	29	21	32
3532	5	17	20	17
3533	15	29	14	15
$\bar{x}$	7	42	24	20
s	4	34	11	8

Tab.28				
Anti- HSA- IgA- Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulin- ämischer UM-B19-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und gleichzeitiger Injektion von LPS.				
Tage nach 1.Injektion	0	8	14	21
Tier-Nr.				
3510	0	1	1	0
3512	0	0	0	0
3518	0	7	0	0
3519	0	0	0	2
3532	0	0	0	0
3533	0	2	0	0
$\bar{x}$	0	2	0	0
s	0	3	0	1

Tab.29 Anti- PSE- IgM- Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulin- ämischer UM-B19-Hühner nach Vorimmunisierung mit HSA + FCA und Immunisierung mit HSA-PSE.					
Tage nach l. Injektion	0	7	15	21	28
Tier-Nr.					
3329	1338	1037	3784	2675	3182
3444	993	1057	5388	4691	5388
3446	889	1173	4169	2694	1537
3447	558	908	4317	7259	4563
3448	1206	1206	3410	3810	4055
3459	664	986	2584	1647	1741
$\bar{x}$	941	1061	3942	3796	3411
s	302	112	942	1994	1549

Tab.30 Anti- PSE- IgA- Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulin- ämischer UM-B19-Hühner nach Vorimmunisierung mit HSA + FCA und Immunisierung mit HSA-PSE.					
Tage nach l. Injektion	0	7	15	21	28
Tier-Nr.					
3329	1	0	2	3	10
3444	2	2	0	0	0
3446	3	4	2	0	0
3447	0	0	0	3	0
3448	5	0	0	0	9
3459	4	4	3	4	3
$\bar{x}$	3	2	1	2	4
s	2	2	1	2	5

Tab.31
Anti- PSE- IgG- Titer (ELISA-Einheiten/ml) immunologisch
intakter LSL-Hühner nach Vorimmunisierung mit HSA + FCA und
Immunsierung mit HSA-PSE.

Tage nach l.Injektion	0	7	15	21	28
Tier-Nr.					
480	586	586	415	1042	3318
481	483	521	517	503	4926
482	669	940	1102	960	2771
483	1485	1625	4318	3760	10059
484	669	1301	1338	1893	3785
485	790	1505	1803	1485	3388
$\bar{x}$	780	1080	1582	1607	4708
s	360	470	1437	1157	2719

Tab.32
Anti- PSE- IgM- Titer (ELISA-Einheiten/ml) immunologisch
intakter LSL-Hühner nach Vorimmunisierung mit HSA + FCA und
Immunsierung mit HSA-PSE.

Tage nach l.Injektion	0	7	15	21	28
Tier-Nr.					
480	1840	3226	3387	5205	6190
481	883	1484	5314	2657	2329
482	558	1905	3410	2621	1705
483	486	920	2445	1945	2070
484	637	801	3204	2266	2462
485	547	946	1537	1257	2250
$\bar{x}$	825	1547	3216	2659	2834
s	516	923	1256	1350	1665

Tab.33 Anti- PSE- IgA- Titer (ELISA-Einheiten/ml) immunologisch intakter LSL-Hühner nach Vorimmunisierung mit HSA + FCA und Immunisierung mit HSA-PSE.					
Tage nach l.Injektion	0	7	15	21	28
Tier-Nr.					
480	3	3	2	3	8
481	0	0	0	0	1
482	3	4	0	2	13
483	4	1	1	2	2
484	0	2	2	2	3
485	7	5	2	5	0
$\bar{x}$	3	3	1	2	5
s	3	2	1	2	5

Tab.34 Anti- HSA- IgG- Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulin- ämischer UM-B19-Hühner nach Vorimmunisierung mit HSA + FCA und Immunisierung mit HSA-PSE.					
Tage nach l.Injektion	0	7	15	21	28
Tier-Nr.					
3329	0	0	12	12	13
3444	0	0	0	0	0
3446	0	0	0	0	0
3447	0	0	0	0	0
3448	0	0	5	0	0
3459	0	0	31	24	19
$\bar{x}$	0	0	8	6	5
s	0	0	12	10	8

Tab.35 Anti- HSA- IgM- Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulin- ämischer UM-B19-Hühner nach Vorimmunisierung mit HSA + FCA und Immunisierung mit HSA-PSE.					
Tage nach l. Injektion	0	7	15	21	28
Tier-Nr.					
3329	2	2	89	24	56
3444	4	6	59	30	32
3446	7	5	11	4	2
3447	8	10	82	25	27
3448	5	7	58	19	15
3459	3	4	117	65	79
$\bar{x}$	5	6	69	28	35
s	2	3	36	20	28

Tab.36 Anti- HSA- IgA- Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulin- ämischer UM-B19-Hühner nach Vorimmunisierung mit HSA + FCA und Immunisierung mit HSA-PSE.					
Tage nach l. Injektion	0	7	15	21	28
Tier-Nr.					
3329	3	2	13	8	9
3444	0	0	1	0	0
3446	2	2	0	1	2
3447	0	0	4	0	0
3448	0	0	19	5	3
3459	0	1	15	9	9
$\bar{x}$	1	1	9	4	4
s	1	1	8	4	4

Tab.37
Anti- HSA- IgG- Titer (ELISA-Einheiten/ml) immunologisch
intakter LSL-Hühner nach Vorimmunisierung mit HSA + FCA und
Immunisierung mit HSA-PSE.

Tage nach 1.Injektion	0	7	15	21	28
Tier-Nr.					
480	14	14	2810	946	387
481	13	15	82	32	46
482	67	53	1694	847	236
483	47	37	5352	2462	1125
484	13	8	707	219	125
485	7	8	353	140	59
$\bar{x}$	27	23	1833	774	330
s	24	18	1994	910	410

Tab.38
Anti- HSA- IgM- Titer (ELISA-Einheiten/ml) immunologisch
intakter LSL-Hühner nach Vorimmunisierung mit HSA + FCA und
Immunisierung mit HSA-PSE.

Tage nach 1.Injektion	0	7	15	21	28
Tier-Nr.					
480	8	22	281	56	46
481	7	12	53	26	24
482	5	13	60	35	26
483	39	20	95	69	53
484	4	11	39	21	15
485	7	15	22	21	22
$\bar{x}$	12	16	92	38	31
s	13	5	96	20	15

Tab.39

Anti- HSA- IgA- Titer (ELISA-Einheiten/ml) immunologisch intakter LSL-Hühner nach Vorimmunisierung mit HSA + FCA und Immunisierung mit HSA-PSE.

Tage nach l.Injektion	0	7	15	21	28
Tier-Nr.					
480	0	0	33	9	6
481	0	0	0	0	0
482	0	0	12	7	6
483	0	0	21	13	5
484	0	0	0	0	0
485	3	2	4	4	2
$\bar{x}$	1	0	12	6	3
s	1	1	13	5	3

Tab.40

Anti- PSE- IgG- Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulinämischer UM-B19-Hühner nach Vorimmunisierung mit HSA + FCA und Immunisierung mit HSA-PSE + Levamisol.

Tage nach l.Injektion	0	7	15	21	28
Tier-Nr.					
3479	0	0	0	0	0
3482	0	0	0	0	0
3487	0	0	0	0	0
3490	0	0	0	0	0
3491	0	0	54	0	0
3492	0	0	0	0	0
$\bar{x}$	0	0	9	0	0
s	0	0	22	0	0

Tab.41
Anti- PSE- IgM- Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulin-
ämischer UM-B19-Hühner nach Vorimmunisierung mit HSA + FCA und
Immunisierung mit HSA-PSE + Levamisol.

Tage nach 1.Injektion	0	7	15	21	28
Tier-Nr.					
3479	379	466	2158	2085	1705
3482	486	444	1547	1338	1301
3487	384	747	6147	6147	3580
3490	493	753	1765	1181	883
3491	722	883	2496	1505	1248
3492	1395	1240	2969	1240	3605
$\bar{x}$	643	756	2847	2249	2054
s	389	294	1695	1937	1220

Tab.42
Anti- PSE- IgA- Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulin-
ämischer UM-B19-Hühner nach Vorimmunisierung mit HSA + FCA und
Immunisierung mit HSA-PSE + Levamisol.

Tage nach 1.Injektion	0	7	15	21	28
Tier-Nr.					
3479	0	0	0	0	0
3482	29	15	15	21	23
3487	17	23	125	225	148
3490	49	55	27	17	30
3491	10	13	46	12	18
3492	11	13	22	7	11
$\bar{x}$	19	20	39	47	38
s	17	19	45	88	55

Tab.43

Anti- HSA- IgG- Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulin-
ämischer UM-B19-Hühner nach Vorimmunisierung mit HSA + FCA und
Immunsierung mit HSA-PSE + Levamisol.

Tage nach 1.Injektion	0	7	15	21	28
Tier-Nr.					
3479	0	0	6	8	7
3482	0	0	0	0	0
3487	0	0	12	11	8
3490	0	0	38	35	33
3491	0	0	0	0	0
3492	0	0	38	28	21
$\bar{x}$	0	0	16	14	12
s	0	0	18	15	13

Tab.44

Anti- HSA- IgM- Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulin-
ämischer UM-B19-Hühner nach Vorimmunisierung mit HSA + FCA und
Immunsierung mit HSA-PSE + Levamisol.

Tage nach 1.Injektion	0	7	15	21	28
Tier-Nr.					
3479	21	16	98	118	98
3482	37	28	63	53	75
3487	15	17	203	113	134
3490	13	15	113	43	47
3491	29	38	125	103	75
3492	46	29	330	84	91
$\bar{x}$	27	24	155	86	87
s	13	9	97	32	29

Tab.45

Anti- HSA- IgA- Titer (ELISA-Einheiten/ml) dysgammaglobulinämischer UM-B19-Hühner nach Vorimmunisierung mit HSA + FCA und Immunisierung mit HSA-PSE + Levamisol.

Tage nach l.Injektion	0	7	15	21	28
Tier-Nr.					
3479	0	0	5	6	5
3482	0	0	4	3	3
3487	0	0	12	7	7
3490	3	3	11	5	6
3491	0	0	12	0	2
3492	2	0	8	2	2
$\bar{x}$	1	1	9	4	4
s	1	1	4	3	2

Tab.46

Serum-IgG-Konzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) dysgammaglobulinämischer UM-B19-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und ständiger Boosterung mit HSA-PSE, zum Teil unter Einsatz von FCA.

Tage nach l.Injektion	0	14	21	25	29	33	45
Tier-Nr.							
3341	79	70	268	226	141	90	65
3353	#	#	#	#	#	#	#
3385	#	#	#	55	#	#	#
3416	73	69	540	1292	491	407	214

= unterhalb der Nachweisgrenze ($< 20 \mu\text{g/ml}$)

Tab.47

Serum-IgG-Konzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) dysgammaglobulinämischer UM-B19-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und separater Injektion von LPS nach 6, 8 und 15 Wochen.

Tage nach 1. Injektion	0	8	14	21	42	49	56	63	105	112
Tier-Nr.										
3253	#	#	#	#	#	#	#	#	43	83
3315	#	26	#	#	#	#	#	#	#	#
3410	24	61	20	#	62	75	55	#	#	82
3411	28	117	39	39	#	#	#	#	82	69
3414	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#
3421	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#

Tab.48

Serum-IgG-Konzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) dysgammaglobulinämischer UM-B19-Hühner nach Immunisierung mit HSA-PSE und gleichzeitiger Injektion von LPS.

Tage nach 1. Injektion	0	8	14	21
Tier-Nr.				
3510	60	122	108	103
3512	#	137	79	70
3518	46	242	165	152
3519	139	350	269	218
3532	318	895	872	1003
3533	167	238	210	400

= unterhalb der Nachweisgrenze ($< 20 \mu\text{g/ml}$)

Tab.49 Serum-IgG-Konzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) dysgammaglobulinämischer UM-B19-Hühner nach Vorimmunisierung mit HSA + FCA und Immunisierung mit HSA-PSE.					
Tage nach 1.Injektion	0	7	15	21	28
Tier-Nr.					
3329	47	47	170	160	140
3444	#	#	54	#	75
3446	#	67	120	94	#
3447	#	#	#	#	#
3448	#	#	57	#	#
3459	62	70	370	330	230

Tab.50 Serum-IgG-Konzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) dysgammaglobulinämischer UM-B19-Hühner nach Vorimmunisierung mit HSA + FCA und Immunisierung mit HSA-PSE + Levamisol.					
Tage nach 1.Injektion	0	7	15	21	28
Tier-Nr.					
3479	97	104	130	110	117
3482	#	#	73	88	#
3487	150	120	139	134	114
3490	157	170	228	235	271
3491	52	46	#	52	54
3492	185	204	311	432	#

= unterhalb der Nachweisgrenze ($< 20 \mu\text{g/ml}$)

Tab.51
Anti-PSE-Titer (ELISA-Einheiten/ml) von Kaninchen nach
Immunisierung mit BSA-PSE, zum Teil unter Einsatz von FCA.

Tage nach 1. Injektion	Kaninchen X	Kaninchen Y	Kaninchen Z
0	45	0	57
14	0	124	57
28	64	94	128
42	38	1161	155
56	64	1265	153
63	53	1240	574
77	57	1291	-
98	0	1383	-
119	0	1272	-
126	0	913	-
147	0	-	-
155	0	-	-

8. LITERATURVERZEICHNIS

ALLISON, A.G. and A.J.S. DAVIES, 1971

Requirement of thymus - dependant lymphocytes for potentiation by adjuvants of antibody formation.

Nature 233, 330-332

ALTMANN, B., 1984

Die Beeinflussung gestörter und unreifer Immunsysteme durch bakterielles Lipopolysaccharid am Beispiel des Haushuhns.

Diss. Universität München

AVRAMEAS, S. and T. TERNYNCK, 1969

The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents.

Immunochemistry 6, 53-66

AXÉN, R., J. PORATH and S. ERNBACK, 1967

Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides.

Nature 214, 1302-1304

BRADFORD, M.M., 1976

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal. Biochem. 72, 248-254

BRÜGGEMANN, J., M. MERKENSCHLAGER, B. KIRCHNER und U. LÖSCH, 1967

Eine erbliche Hypo- bzw. Dysgammaglobulinämie beim Haushuhn.

Naturwissenschaften 54, 1-2

CAULFIELD, M.J. and D. SHAFER, 1984

A computer program for the evaluation of ELISA data obtained using an automated microtiter plate absorbance reader.

J. Immunol. Methods 74, 205-215

CHANH, E.L. and C. HENRY, 1976

Coexistence of helper and suppressor activities in carrier primed spleen cells.

J. Immunol. 117, 1132-1138

CHILLER, J.M. and W.O. WEIGLE, 1973

Termination of tolerance to human gamma globulin in mice by antigen and bacterial lipopolysaccharide (endotoxin).

J. Exp. Med. 137, 740-750

COLE, S.P.C., D. KOZBOR, and J.C.C. RODER, 1985

Regulation of antibody class.

In: SPRINGER, T.A. (Ed.)

Hybridoma technology in the biosciences and medicine.

Plenum Press, New York and London, pp. 8-9

COUTINHO, A., E. GRONOWISZ, W.W. BULLOCK and G. MÖLLER, 1974

Mechanism of thymus-independent immunocyte triggering. Mitogenic activation of B cells result in specific immune responses.

J. Exp. Med. 139, 74-92

DAVIES, D.R., 1963

Neurotoxicity of organophosphorous compounds

in: Handbuch der experimentellen Pharmakologie

Ergänzungswerk XV

Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, pp. 860-882

DEL GUERCIO, P., 1972

Effect of adjuvants on the antibody response to a hapten on a thymus-independent carrier.

Nature New Biol. 238, 213-215

ENGVAL, E. and P. PERLMANN, 1971

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

Quantitative assay of immunoglobulin G.

Immunochemistry 8, 871-874

ENGVAL, E. and P. PERLMANN, 1972

ELISA: III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes.

J. Immunol. 109, 129-135

ERLANGER, B.F., 1980

The preparation of antigenic hapten-carrier conjugates:
A survey

Meth. Enzymol. 70, 85-104

ERICKSON, K.L., M.E. GERSHWIN, H. ABPLANALP, R. IKEDA, and
A.A. BENEDICT, 1982

Inherited 7S immunoglobulin deficiency of chickens is associated with bursal degeneration anomalies.

Dev. Comp. Immunol. 6, 105-112

FENTON, J.W. and S.J. SINGER, 1971

Affinity labeling of antibodies to the p-azophenyltrimethylammoniumhapten, and a comparison of affinity-labeled antibodies to two different specificities.

Biochemistry 10, 1429-1437

FIEDLER, H., U. LÖSCH and K. HALA, 1980

Establishment of a B-compatible chickenline with normogammaglobulinemia and dysgammaglobulinemia.

Folia Biologica, Praha 26, 17-25

FIEDLER, H., M. SCHEU, I. KÜHLMANN-RABENS and U. LÖSCH, 1981

Kinetics of delayed - type hypersensitivity (DTH) reactions and IgG - levels in FCA - injected dysgammaglobulinemic Bl2 chickens.

Immunobiol. 158, 293-302

FORNI, L., 1985

From the point of view of the B-cell :

Considerations on B-cell activation.

Scand. J. Immunol. 22, 235-243

FRENCH, V.J., J.M. STARK, and R.G. WHITE, 1970

The influence of adjuvants on the immunological response of the chicken.

II. Effect of Freund`s complete adjuvant on later antibody production after a single injection of immunogen.

Immunology 18, 645-655

FÜRST. K., 1965

Massive Vergiftungserscheinungen bei der Entdasselung mittels des Phosphorester-Präparates Neguvon.

Wiener tierärztliche Monatsschrift 52, 919-923

FUNG, J. and H. KÖHLER, 1980

Mechanism of neonatal idiotypic suppression.

I. State of the suppressed B-cells.

J. Immunol. 125, 1998-2003

GERSHWIN, M.E., K. ERICKSON, J. MONTERO, H. ABPLANALP,
J. EKLUND, A.A. BENEDICT, and R.M. IKEDA, 1980

The immunopathology of spontaneously acquired dysgammaglobulinemia in chickens.

Clin. Immunol. Immunopathol. 17, 15-30

GOLDSTEIN, G., 1978

Mode of action of levamisole.

J. Rheumatol. 5, 143-148

GROB, B., 1963

Anticholinesterase intoxication in man and its treatment
in: Handbuch der experimentellen Pharmakologie

Ergänzungswerk XV,

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp.990-1027

HOFFMANN-FEZER, G. and U. LÖSCH, 1983

Distribution of IgM-, IgG-, and IgA-positive cells in
lymphatic organs of normo- and dysgammaglobulinemic UM-B19
chickens.

Int. Archs. Allergy appl. Immun. 70, 346-351

HOVI, T., J. SUNI, L. HORTLING, and A. VAHERI, 1978

Stimulation of chicken lymphocytes by T- and B-cell-mitogens.

Cell. Immunol. 39, 70-78

HUCHET, R. and D. GRANDJON, 1985

Hapten-specific unresponsiveness in mice.

III. Study of the B-cell functions of tolerant mice.

Scand. J. Immunol. 21, 337-343

HUNTER, K.W. and D.E. LENZ, 1981

Detection and quantification of the organophosphate insecticide Paraoxon by competitive inhibition enzyme immunoassay.

Life Sciences 30, 355-361

HUNTER, K.W., D.E. LENZ, A.A. BRIMFIELD, and J. NAYLOR, 1982

Quantification of the organophosphate nerve agent soman by competitive inhibition enzyme immunoassay using monoclonal antibody.

FEBS Letters 149, 147-151

HURN, B.A.L. and S.H. CHANTLER, 1980

Production of reagent antibodies.

Meth. Enzymol. 70, 104-142

IVANYJ, J., 1977

Functions of the B-lymphoid systems in chickens.

In: ROSE, M.E., L.N. PAYNE, and B.M. FREEMAN (Eds.)

Avian immunology

British Poultry Science Ltd., Edinburgh

IZUI, S., R.A. EISENBERG, and F.J. DIXON, 1981

Subclass-restricted IgG polyclonal antibody production in mice injected with Lipid A - rich lipopolysaccharides.

J. Exp. Med. 153, 324-338

JACKSON, J.B., R.O. DRUMMOND, W.B. BUCK, and L.M. HUNT, 1960

Toxicity of organic phosphorous insecticides to horses.

J. Econ. Entomol. 53, 602-603

JOLLY, D.W., 1957

The toxicity of organic phosphorous insecticides.

Vet. Rec. 69, 769-800

JORMALAINEN, S. and O. MÄKELÄ, 1971

Anti - haptens antibodies in normal sera.

Eur. J. Immunol. 1, 471-478

KATZ, D.H., W.E. PAUL, E.A. GOIDL, and B. BENACERRAF, 1970

Carrier function in antihapten immune responses.

I. Enhancement of primary and secondary antihapten antibody responses by carrier preimmunization.

J. Exp. Med. 132, 261-281

KLUMPNER, W., 1980

Verlaufsuntersuchungen über die postnatalen Immunglobulinkonzentrationen im Serum normo- und dysgammaglobulinämischer Bl2 Hühner.

Diss. Universität München

KOELLE, G.B., 1957

Histochemical demonstration of reactivation of acetylcholinesterase in vivo.

Science 125, 1195-1196

KOLB, C., R. DI PAULI, and E. WEILER, 1976

Induction of IgG in young nude mice by Lipid A and thymus grafts.

J. Exp. Med. 144, 1031-1037

KRAFT, W., 1984

Vergiftungen.

in: Kleintierkrankheiten

Band 1: Innere Medizin

Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, pp. 275-280

KÜHLMANN-RABENS, I., R. WANKE, F. STORANDT, B. ALTMANN,
U. LÖSCH, and M. MERKENSCHLAGER, 1987

Attempts to localize the defect in dysgammaglobulinemia of
UM-B19 chickens by studying the effect of immunomodulating
substances on immunoglobulin and antibody production.
Vet. Immunol. Immunopath. 14, 123-143

LANDSTEINER, K., 1945

The specificity of serological reactions.
Harvard University Press, Cambridge, Mass.

LAURELL, C.B., 1966

Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in
agarose gel containing antibodies.
Anal. Biochem. 15, 45-52

LEUZINGER, S. und A. PASI, 1970

Die Vergiftung mit phosphororganischen Insektiziden bei
Haus- und Nutztieren.
Schweiz. Arch. Tierheilkd. 112, 269-279

LIU, M.T., B.P. RAM, L.P. HART, and J.J. PESTKE, 1985

Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the myco-
toxin Zearalenone.
Appl. Environ. Microbiol. 50, 332-336

LÖSCH, U. und G. HOFFMANN-FEZER, 1973

Vergleichende histologische und immunologische Unter-
suchungen an immunologisch defekten Hühnern.
Zbl. Vet. Med. 20, 596-605

LÖSCH, U., I. KÜHLMANN, W. KLUMNER, and H. FIEDLER, 1981

Course of serum-Ig concentrations in B 12 chickens of the
UM line.
Immunobiol. 158, 416-425

LÖSCH, U., R. WANKE und M. MERKENSCHLAGER, 1982

Antikörper - Isotypen nach Immunisierung genuin dysgamma-
globulinämischer UM-B19 Hühner.

Zbl. Vet. Med. 29, 365-374

LÖSCH, U., I. SCHRANNER, R. WANKE, and L. JÜRGENS, 1986

The chicken egg, an antibody source.

J. Vet. Med. B 33, 609-619

LOUIS, J.A., J.M. CHILLER, and W.O. WEIGLE, 1973

The ability of bacterial lipopolysaccharide to modulate
the induction of unresponsiveness to a state of immunity.

J. Exp. Med. 138, 1481-1495

LÜTZRODT, W., 1954

Tiervergiftungen durch das Pflanzenschutzmittel E605 forte.

Tierärztliche Umschau 9, 140-141

MATSUMURA, F., 1985

Toxicology of insecticides.

Second Edition

Plenum Press, New York and London

MOODY, C.E., J.B. INNES, G.W. SISKIND, and M.E. WEKSLER, 1978

Tolerance induced by TNP-derivatized syngeneic erythro-
cytes: evidence for cooperation between hapten-specific T
and hapten-specific B lymphocytes in the immune response.

J. Immunol. 120, 844-849

MULCAHY, G. and J. QUINN, 1986

A review of immunomodulators and their application in
veterinary medicine.

J. Vet. Pharmacol. Therap. 9, 119-139

ORLANS, E., B.J. SAUNDERS, and M.E. ROSE, 1968

Fowl antibody.

IX. The different responses to the hapten and carrier moieties of 2,4,-Dinitrophenyl-bovine-gammaglobulin.

Immunology 14, 53-59

PERKOW, W., 1974

Wirksubstanzen der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel.

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

PÉTERFY, F., P. KUUSELA and O. MÄKELÄ, 1983

Requirements for antibody assays mapped by monoclonal antibodies.

J. Immunol. 130, 1809-1813

PETERSON, R.D., G.V. ALM, and S. MICHALEK, 1971

The effect of bursectomy on the recovery from immunologic tolerance.

J. Immunol. 106, 1609-1614

PINCKARD, R.N., 1978

Equilibrium dialysis and preparation of hapten conjugates.
in: Weir, D.M. (Ed.)

Handbook of Experimental Immunology
Blackwell Scientific Publications,
Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, pp. 17.1-17.23

RAPPAPORT, F., J. FISCHL and N. PINTO, 1959

An improved method for the estimation of cholinesterase activity in serum.

Clin. Chim. Acta 4, 227-230

REECE, R.L. and P. HANDSON, 1982

Observations on the accidental poisoning of birds by organophosphate insecticides and other toxic substances.

Vet. Rec. 111, 453-455

RENOUX, G. and M. RENOUX, 1977

Thymus-like activities on T-cell differentiation.

J. Exp. Med. 145, 466-471

SACHS, L., 1976

Statistische Methoden.

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

SARVAS, H., O. MÄKELÄ, P. TOIVANEN, and A. TOIVANEN, 1974

Effect of carrier preimmunization on the anti-hapten response in the chicken.

Scand. J. Immunol. 3, 455-460

SASS, S., T.L. FISHER, R.J. STEGER, and G.A. PARKER, 1982

Gas chromatographic methods for the analysis of trace quantities of isopropyl methylphosphonofluoridate and associated compounds, in situ and in decontamination effluent.

J. Chromatogr. 238, 445-456

SCHMID, H., 1962

Der gegenwärtige Einblick in den Mechanismus der Diazotierung.

Chemiker-Ztg. / Chem. Apparatur 22, 809-844

SCHRANNER, I., U. LÖSCH und M. MERKENSCHLAGER, 1982

Das Serumproteinmuster des Haushuhns. Vergleichende Darstellung der Serumproteine normaler und defekter Hühner.

Zbl. Vet. Med. A 29, 327-336

SEGAL, S., A. GLOBERSON, and M. FELDMANN, 1971

A bicellular mechanism in the immune response to chemically defined antigens.

Cellular Immunology 2, 205-221

SILVESTRI, G.R., 1977

New techniques to measure blood cholinesterase activity in domesticated animals.

Am. J. Vet. Res. 38, 659-662

SNIPPE, H. and E. KAMP, 1975

Cell co-operation and hapten-carrier complexes.

Immunology 29, 675-685

SPARKS, K. and M. BALLOW, 1983

The indirect ELISA for quantitation of specific antibody: Analysis of antibody dilution curves.

Diag. Immunol. 1, 269-275

STARKER, H., 1978

Die Beeinflussung der Serum- Immunglobulin- Konzentrationen genuin dysgammaglobulinämischer Hühner durch Freundsches komplettes Adjuvans.

Diss. Universität München

SUTER, M., 1982

A modified ELISA technique for anti-hapten antibodies.

J. Immunol. Methods 53, 103-108

SUTTAR, J., Z. HRKAL, and Z. VODRÁŽKA, 1977

Affinity chromatography of serum haemopexin.

J. Chromatogr. 131, 453-457

SYMOENS, J., M. ROSENTHAL, M. DE BRABANDER, and G. GOLDSTEIN, 1979

Immunoregulation with levamisole.

Springer Semin. Immunopathol. 2, 49-68

TABACHNIK, M. and H. SOBOTKA, 1959

Azoproteins

I. Spectrophotometric studies of amino acid azo derivatives.

J. Biol. Chemistry 234, 1726-1730

TAM, L.Q. and A.A. BENEDICT, 1975

Elevated 7S immunoglobulin and acute phase proteins in adjuvant-injected chickens.

Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 150, 340-346

TRÜBY, M., 1987

Untersuchungen zur Antikörperantwort verschiedener Hühnerlinien mit Hilfe eines haptenspezifischen ELISA-Systems.

Diss. Universität München

VAN WEEMEN, B.K. and A.H.W.M. SCHUURS, 1976

Sensitivity and specificity of hapten enzyme-immunoassays.

In: Feldmann, G., P. Druet, J. Bignon and S. Avrameas
(Eds.) Immunoenzymatic Techniques

American Elsevier Publ. Comp. Inc., New York, pp. 125-133

WANKE, R., 1982

Untersuchungen zur Immunantwort dysgammaglobulinämischer Hühner der Linie UM-B19.

Diss. Universität München

WEGLER, R. (Ed.), 1970

Chemie der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel
Band 1

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 377-379

Herrn Prof. Dr. U. Lösch danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und für seine stete Hilfsbereitschaft, Unterstützung und Diskussionsbereitschaft bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. M. Merckenschlager und Herrn Prof. Dr. H. Zucker bedanke ich mich für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Für fachliche Beratung in toxikologischen Fragen möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. A. Schmid bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. P. Schmidt für die gute Einarbeitung in das Thema und für die vorbildliche intensive Betreuung, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Für gute Tips und tatkräftige Hilfe in allen technischen Fragen danke ich Herrn N. Göller.

Den Tierpflegern des Instituts, insbesondere Herrn F. Meggendorfer danke ich für die hervorragende und engagierte Betreuung der Tiere.

Allen anderen Mitarbeitern des Labors danke ich für die stets freundlich gewährte Hilfe.

LEBENS LAUF

25.07.1953	Geboren in Heilbronn als Sohn von Adolf und Anneliese Kühlmann, geb. Mühleisen
1960 - 1964	Grundschule in Heilbronn
1964 - 1971	Robert-Mayer-Gymnasium in Heilbronn
1971 - 1979	Soldat auf Zeit bei der Bundeswehr
1978 - 1980	Bundeswehrfachschule in München
20.06.1980	Allgemeine Hochschulreife
18.02.1977- 22.04.1982	Verheiratet mit Jutta Kühlmann, geb. Merk
1980 - 1985	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
26.11.1985	Staatsexamen
20.01.1986	Approbation
seit Dezember 1985	Anfertigung der vorliegenden Dissertation
April 1986 - September 1986	Teilzeitbeschäftigte wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
18.08.1986	Heirat mit Angelika Kühlmann, geb. Stabel
seit Oktober 1986	Wissenschaftlicher Angestellter am o.g. Institut

